Zusammenhang zwischen Stresstoleranz, Diversität und katabolischer Vielseitigkeit schwermetallgestresster Bodenpilze

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von

Michael Stelzer

aus Braunschweig

1. Referent:	Prof. Dr. H.-J. Aust
2. Referent:	Prof. Dr. O. Larink
eingereicht am:	10.10.2002
mündliche Prüfung am:	12.12.2002

2003

1. Einleitung und Stand der Forschung

1.1 Zusammenhang zwischen Umweltfaktoren, Überlebensstrategie und Diversität

Mikroorganismengemeinschaften sind wie die Arten, aus denen sie bestehen, von den Umweltfaktoren abhängig, deren Wirkung von der jeweiligen Intensität oder Konzentration bestimmt wird. Bei den meisten Umweltfaktoren lässt sich ein suboptimaler bzw. Mangelbereich, ein optimaler und ein schädlicher bzw. toxischer Bereich unterscheiden. Bei wenigen anderen Faktoren (z.B. nicht essentiellen Elementen) lässt sich dagegen nur ein indifferenter und ein schädlicher (toxischer) Bereich erkennen (Stadelmann und Santschi-Fuhrimann, 1987). Man kann davon ausgehen, dass sich die Mikroorganismen nicht nur hinsichtlich ihrer Optima unterscheiden, sondern auch, dass es, abhängig von der betrachteten Fähigkeit, sogar bei jedem Organismus unterschiedliche Optima gibt (Schlegel, 1992). Hinsichtlich des Wachstums im Kulturgefäß kann die optimale Temperatur z.B. 28 °C betragen. Tatsächlich wird dieser Wert in unseren Böden im Sommer nur selten angetroffen und ist für das Überleben der Mikroorganismen sicher nicht das Optimum, da andernfalls die ohnehin begrenzten Kohlenstoff (C)- und Energiequellen noch schneller verbraucht würden. Ähnliches gilt für die Verfügbarkeit des Stickstoffs (N). Suboptimale Bedingungen oder Mangel sind zwar nicht unmittelbar die Ursache vielfältiger Mikroorganismengemeinschaften, wahrscheinlich schaffen sie aber durch die Verlangsamung des Stoffwechsels Stabilität und tragen so zur Erhaltung der Diversität bei. Positiv für die Erhaltung der Vielfalt wirkt sich vermutlich auch aus, dass die Bedingungen im Boden in einem von Jahreszeit und Witterungsverlauf bestimmten Bereich oszillieren, aber auch räumlich variieren, so dass abwechselnd die eine oder die andere Art im Vorteil ist. Eine größere Konstanz der Bedingungen würde dagegen zur Anreicherung der bestangepassten Arten und Stämme führen und damit auf Dauer neben der Artenvielfalt auch die Redundanz der Leistungen der Gemeinschaft reduzieren (Reber und Wenderoth, 1997).

Für die Artenvielfalt von Mikroorganismengemeinschaften besonders wichtig ist sicher die Vielfalt und unterschiedliche Qualität der C- und Energiequellen (Gupta, 1967), die Arten und Stämme nicht nur mit unterschiedlicher katabolischer Vielseitigkeit (Wenderoth und Reber, 1999 a) entstehen lassen, sondern auch die Ursache für die Entwicklung unterschiedlicher Überlebensstrategien sind. Schnell wachsende Arten bzw. Stämme (sogenannte r-Strategen) sind vorrangig auf energetisch gute (schnell fließende) C- und Energiequellen in vergleichsweise hoher Konzentration angewiesen, während die langsam wachsenden K-Strategen mit weniger

guten Substraten und/oder niedrigeren Konzentrationen auskommen und sich dabei gegenüber den r-Strategen durchsetzen (Andrews, 1984; Gisi, 1990). Die Bezeichnungen r und K stammen ursprünglich aus einer Beschreibung der Lebensstrategie von Makroorganismen (Gadgil und Solbrig, 1972; Pianka, 1970). MacArthur und Wilson (1967) wendeten diese Klassifizierung auf Tiere an. Nach Odum (1980) beruht die Einteilung in r- und K-Strategen auf dem Verhältnis der Nutzungsanteile der verfügbaren Energie für die Fortpflanzung bzw. die Erhaltung der Arten. Demnach sind r-Strategen Organismen mit hoher Vermehrungsrate (hohes Verhältnis von Fortpflanzungsenergie zu Erhaltungsenergie) sowie geringer Lebensdauer und K-Strategen Organismen mit vergleichsweise geringem Fortpflanzungspotential sowie hoher Lebensdauer. In der Bodenmikrobiologie wurden die beiden gegensätzlichen Strategien schon vor mehr als 75 Jahren mit der Unterscheidung allochthoner (zymogener) und autochthoner Arten erkannt (Winogradsky, 1924), die Synonyme für r- und K-Strategen sind. Laut Alexander (1997) stellt sich in einer Mikroorganismengemeinschaft ein physiologisches Gleichgewicht (*steady-state*) ein, wenn die Biomasse einen annähernd konstanten Minimalwert erreicht hat und der Anteil der K-Strategen an der Gesamtgemeinschaft besonders hoch ist. Der früheste Zeitpunkt dieses Zustands im Boden, der sich an einem niederen Verhältnis von Basalatmung zu glukoseinduzierter Atmung erkennen lässt (Anderson, 1994), ist nach Reber und Wenderoth (1997) optimal für vergleichende Analysen der Diversität von Mikroorganismengemeinschaften.

Der nach jeder Vegetationsperiode einsetzende sequenzielle Abbau von Pflanzenrückständen mit der Anreicherung schwer abbaubarer organischer Substanz und die damit einhergehende Organismensukzession weisen auf die positive Wirkung der C- und Energiequellen für die Artenvielfalt organotropher Mikroorganismen hin. Die Einbringung einseitiger C-Quellen in den Boden hat wahrscheinlich keine Wirkung auf die Vielfalt der Mikroorganismen. Jedoch ist damit zu rechnen, dass die Gleichmäßigkeit der Artverteilung (*evenness*; Pielou, 1966) durch eine solche Störung kurzfristig abnimmt. Mit der Abnahme der *evenness* würde auch der *Shannon-Index* der Diversität (das Produkt aus *evenness* und Logarithmus des Artenreichtums der Gemeinschaft; Shannon und Weaver, 1969) kleiner werden. Einen positiven Einfluss auf die mikrobielle Diversität haben auch Predatoren und Parasiten (z.B. Protozoen), durch deren Aktivität vor allem häufige Bakterien- und Pilzarten dezimiert werden (Wild, 1995).

Bei fortdauernder Einbringung einseitiger C-Quellen, z.B. in Monokulturböden, ist ein Rückgang der Mikroorganismenvielfalt zwar noch nicht direkt beobachtet worden, jedoch deutet die Steigerung der Biomasseatmung (Anderson und Domsch, 1990) auf eine solche Veränderung hin. Das Gleiche wäre bei lang andauerndem Energiemangel zu erwarten: entsprechend

ihrer unterschiedlichen Überlebensstrategie würden Organismen mit den höchsten Ansprüchen an Qualität und Konzentration von C-Quellen als erste aus einer Lebensgemeinschaft verschwinden. Unterstützt wird diese These durch Degens et al. (2000), die fanden, dass Mangel an verfügbarem Kohlenstoff im Boden zu einer reduzierten katabolischen Diversität in Mikroorganismengemeinschaften führt.

Eine Reduktion der Artenvielfalt ist auf jeden Fall zu erwarten, wenn die Intensität bzw. Konzentration physikalischer und chemischer Faktoren über den jeweils optimalen Bereich der einzelnen Arten hinausgeht, d.h. wenn die Organismen gestresst sind (Atlas, 1984; Odum, 1985). Stress wird u.a. hervorgerufen durch zu hohe Strahlung (z.B. Temperatur) oder zu hohe Protonen- bzw. Schwermetallkonzentrationen in der Bodenlösung. Schwermetalle können an Sulfhydryl (SH)-Gruppen von Enzymen andocken, Proteinstrukturen verändern und kompetitiv aktive Zentren von Enzymen hemmen (Tyler, 1981; Tyler et al., 1989). Mikroorganismen haben im Lauf der Evolution zwar Fähigkeiten entwickelt, mit den verschiedenen Arten von Stress fertig zu werden, d.h. sie haben unterschiedliche Grade von Toleranz bzw. Resistenz entwickelt, die ihnen ein Überleben in sauren oder kontaminierten Habitaten ermöglichen (Dean-Ross und Mills, 1989; Duxburry und Bicknell, 1983; Mills und Colwell, 1977). Fähigkeiten, wie z.B. die Aktivierung von Ionenpumpen (Wood, 1984), die toxische Ionen aus der Zelle befördern oder die Synthese von Metallothioneinen, die in das Zellinnere gelangte Schwermetalle an SH-Gruppen binden (Gadd, 1989), erfordern aber einen Teil der den Mikroorganismen zur Verfügung stehenden Energie, die andernfalls der Zellvermehrung oder dem Zellerhalt dienen könnte (Wood und Wang, 1983). Dies ist auch der Grund, warum die mikrobielle Biomasse in sauren oder schwermetallkontaminierten Böden einen höheren Atmungsquotienten (qCO_2) aufweist und im Vergleich mit neutralen bzw. nicht kontaminierten Böden abnimmt (Anderson und Domsch, 1993; Brookes und McGrath, 1984; Brookes et al., 1986; Fließbach et al., 1994). In Klärschlämmen ist die negative Wirkung der Schwermetalle oft stärker, als der positive Effekt der mit dem Schlamm ausgebrachten organischen Substanz (Chander und Brookes, 1991; 1993).

Bakterien haben eine bisher nicht beachtete Möglichkeit, ihre Toleranz gegenüber Schwermetallen zu steigern: sie “verlieren“ anscheinend Fähigkeiten zur Nutzung seltener, meist schwer abbaubarer aromatischer Säuren. Dies gilt für die Gemeinschaftsebene (Burkhardt et al., 1993; Reber, 1992; Wenderoth und Reber, 1999 a), aber auch für die Artebene (Wenderoth et al., 2001) und ist damit zu erklären, dass sich zufällige Verlustmutanten unter den Stressbedingungen anreichern. Der mögliche biochemische und ökologische Nutzen verminderter katabolischer Vielseitigkeit wurde darin gesehen, dass Bakterien ohne die genannten Fähig-

keiten unter Schwermetallstress von energetisch nutzlos gewordenen Substraten (Reber und Wenderoth, 1997) nicht mehr zur Synthese katabolischer Enzyme gezwungen werden können und, wegen der Beschränkung vor allem auf energetisch profitable Substrate, ihren Stoffwechsel relativ beschleunigen können. Dies ist möglicherweise für die Aufrechterhaltung von Toleranzmechanismen notwendig und kann erklären, warum Arten ohne diesen Mechanismus aus einer Gemeinschaft verschwinden können und so deren Diversität abnehmen lassen. Weiter wurde diskutiert, dass Bakterien, die weniger genetische Information weitergeben müssen, von den noch verfügbaren, leichter abbaubaren Substraten zwar kleinere, aber evtl. mehr und potentiell schneller wachsende Zellen bilden. Diese These wird durch Ergebnisse von Modi et al. (1991) und Bowater et al. (1996) gestützt. Die Abnahme der katabolischen Vielseitigkeit von Bakterien ließe sich also dahingehend interpretieren, dass die Bedeutung der r-Strategie unter Stress zunimmt.

Die bisher geschilderten Zusammenhänge basieren weitgehend auf Untersuchungen an Bakterien und Boden. Ergebnisse früherer Untersuchungen zur Überlebensstrategie von Pilzen sind von Garrett (1951) und Griffin (1972) zusammengefasst worden. Nach diesen Autoren sind auch bei Pilzen eindeutige Abhängigkeiten von der Qualität der verfügbaren C- und Energiequellen nachgewiesen worden. Bei Abbau von Pflanzenmaterial bevorzugen Erstbesiedler oder Pionierpilze vornehmlich einfache Zucker und Stärke. Burges (1939) verwendete für diese Pilze den Begriff *Zuckerpilze*, um solche Arten zu bezeichnen, die weder Cellulose noch Lignin abbauen können. Häufig liefern die Erstbesiedler die Substrate für die Nachfolgerpilze und die so geschaffenen Substratbedingungen verbessern die Lage einiger Pilze für bestimmte Zeit (Kendrick und Burges, 1962). Die sogenannte Substratsukzession (Park, 1968) verläuft, ausgehend von den *Zuckerpilzen*, über Cellulose- und Keratinabbauer bis hin zu Pilzen, die in der Lage sind, noch weniger gute Substrate wie Tannin oder Lignin als Energiequellen zu nutzen (Griffin, 1972). In einer groben taxonomischen Einteilung hat Garrett (1951) *Zuckerpilze* in erster Linie den Phycomyceten, Celluloseabbauer den Ascomyceten und Fungi Imperfecti sowie Ligninabbauer überwiegend den Basidiomyceten zugeordnet.

Jüngere Arbeiten zur Überlebensstrategie von Pilzen stammen von Pugh (1980) und Cooke und Whipps (1993). In seinem Übersichtsartikel schreibt Pugh (1980), dass die beiden Muster - schnelles Wachstum mit starker Reproduktion und langsames Wachstum mit geringer Reproduktion - zwar der erstmals bei Tieren beschriebenen Strategien r und K (MacArthur und Wilson, 1967) oder ruderalem bzw. kompetitivem und stressangepasstem Verhalten bei Pflanzen (Grime, 1979) entsprechen. In Anbetracht ihres komplexen Verhaltens hielt er die beiden

Extreme r und K aber nicht ausreichend für die Beschreibung der Überlebensstrategien von Pilzen und schlug insgesamt vier Katagorien vor, die das Verhalten gegenüber Stress einschließen (Tab. 1).

Tab. 1: Beschreibung von Überlebensstrategien bei Pilzen (nach Pugh, 1980).

Überlebensstrategie	Merkmale
RUDERALES VERHALTEN	Schnelles Wachstum und starke Sporulation; Überleben bei geringem Stress, hohe Ansprüche an Energiequelle: entsprechend r-Strategie (*Zuckerpilze*).
KOMPETITIVES VERHALTEN	Langsames Wachstum und geringe Sporulation; Überleben bei geringem Stress, geringe Ansprüche an Energiequelle, entspechend K.
STRESS-TOLERANZ	Langsames Wachstum, geringe Sporulation; Überleben bei starkem Stress, geringe Ansprüche an Energiequelle.
ÜBERLEBENDE - FLÜCHTENDE	Pilzarten dieser Kategorien besitzen besondere Strukturen, die das Überleben bei Austrocknung oder UV-Strahlung gewährleisten, z.B. Sklerotien und gefärbte Sporen.

In ihrer Charakterisierung der Überlebensstrategie von Pilzen zählen Cooke und Whipps (1993) dagegen nur die drei Kategorien C, R und S auf, die für wettbewerbsorientiertes (*competitive*/*combative*), ruderales und stressangepasstes Verhalten stehen. Abgeleitet von diesen Hauptkategorien werden jedoch auch die vier sekundären Strategien C-R, S-R, C-S und C-S-R unterschieden.

Das Verhalten eines Pilzes gegenüber Schwermetallstress im Boden wird durch den Besitz bestimmter Toleranz- und/oder Resistenzmechanismen bestimmt. Gadd (1986 b; 1989) ist der Auffassung, dass diese Begriffe nicht ausreichend definiert und häufig nach subjektiven Kriterien verwendet würden. Daher werden sie in dieser Arbeit bis auf Weiteres immer zusammen genannt. Je nach Art, Effektivität und Anzahl der vorhandenen Mechanismen und in Abhängigkeit vom Grad der Kontamination des Habitats können Pilze als tolerant/resistent oder sensitiv gegenüber Schwermetallstress eingestuft werden. Mehrere passive oder aktive Mechanismen haben sich entwickelt, die aber auch einen unterschiedlichen energetischen Anspruch haben. So ist z.B. die Bindung von Schwermetallen an der Zelloberfläche oder extrazellulären Polysaccha-

riden unabhängig, die intrazelluläre Aufnahme (Influx) durch die Zellmembran in der Regel dagegen abhängig vom Stoffwechsel (Gadd, 1986 a). Beide Mechanismen unterstützen die Aufnahme gering konzentrierter Spurenelemente. Bei hohen, toxisch wirkenden Schwermetallkonzentrationen dienen sie der Detoxifizierung. Der Transport überschüssiger Schwermetalle aus der Zelle heraus (Efflux) ist ebenso energieabhängig wie die Ausscheidung organischer Säuren (Citrat oder Oxalat), die Schwermetalle als Chelate oder Kristalle extrazellulär fixieren. Intrazellulär kann eine Akkumulation von Schwermetallen in Vakuolen erfolgen (Gadd, 1986 b). Zu den metabolismusabhängigen Resistenzmechanismen wird auch die Metalltransformation durch Oxidation/Reduktion bzw. durch Methylierung/Demethylierung gezählt, durch die es Pilzen möglich ist, ein toxisches Schwermetall in eine weniger toxische Form zu überführen (Gadd, 1989). Die Detoxifizierung von Schwermetallen kann darüber hinaus auch durch spezielle, schwermetallbindende Proteine erfolgen. Diese ubiquitär verbreiteten Proteine werden als Metallothioneine oder Phytochelatine bezeichnet (Hamer, 1986; Mehra und Winge, 1991; Nielson et al., 1985). Die Synthese der Metallothioneine wird überwiegend spezifisch von den Metallen (z.B. Kupfer oder Cadmium) induziert (Ecker et al., 1986; Munger und Lerch, 1985; Murasugi et al., 1981; Ow et al., 1994). In einem Pilz können durchaus verschiedene metallspezifische Proteine nebeneinander vorkommen (Mehra et al., 1988). Nach Tomsett (1993) lassen sich die genannten Mechanismen in zwei Gruppen einteilen, nämlich in solche der Vermeidung (*avoidance*) und der Abtrennung (*sequestration*) (Tab. 2). Offensichtlich ist es die Kombination verschiedener Toleranz- bzw. Resistenzmechanismen, die das Verhalten eines Pilzes gegenüber Schwermetallen bestimmen (Gadd, 1986 b). Die ungerichtete Mutation von Toleranz- oder Resistenzgenen und die gerichtete Selektion ihrer Produkte in einem Mikroorganismus steigerten sukzessiv dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber einem Stressor. Da aber Mutationen nicht bei allen Arten mit gleicher Rate und Effizienz ablaufen, ist mit der unterschiedlichen Ausprägung von Toleranz oder Resistenz zu rechnen. Obwohl keine generelle Beziehung zwischen Toleranz/Resistenz von Isolaten in Reinkultur und der Schwermetallbelastung des Herkunftstandorts zu bestehen scheint (Arnebrant et al., 1987; Brown und Hall, 1989; Yamamoto et al., 1985), ist anzunehmen, dass weniger angepasste Arten das Feld für die angepassten Arten räumen. Eine Konsequenz wäre die Abnahme der Diversität der betreffenden Gemeinschaft. Beispiele für die Abnahme der Artendiversität in schwermetallbelasteten Waldböden lieferten Jordan und Lechevalier (1975) sowie Nordgren et al. (1983).

Tab. 2: Mechanismen der Schwermetalltoleranz bei Pilzen (nach Tomsett, 1993).

Zellbestandteil/Vorgang	Ergebnis der Mutation	Toleranzmechanismus
Abgesondertes Protein, organisches Molekül oder anorganisches Ion	Erhöhte Produktion, die in Zunahme extrazellulärer Niederschläge resultiert	Vermeidung (*avoidance*)
Pilzliche Zellwand	Erhöhte Metallbindefähigkeit	Vermeidung (*avoidance*)
Permeabilität	Reduzierter Transport in die Zelle oder zunehmender Efflux	Vermeidung (*avoidance*)
Vakuolen	Erhöhter Transport in subzelluläre Kompartimente	Abtrennung (*sequestration*)
Anorganische Chelatoren, z.B. Sulfide	Veränderter Metabolismus	Abtrennung (*sequestration*)
Organische Chelatoren, z.B. Citrat	Veränderter Metabolismus	Abtrennung (*sequestration*)
Metallbindende Proteine	Erhöhte Synthese	Abtrennung (*sequestration*)

Versuche, auch bei Pilzen einen bioenergetischen Zusammenhang zwischen reduzierter Artendiversität einerseits sowie Schwermetalltoleranz und katabolischer Vielseitigkeit auf der Artebene andererseits herzustellen, existieren bisher nicht. Jedoch hat Salonius bereits 1981 auf einen Zusammenhang zwischen Diversität und Abbauleistung von Pilzgemeinschaften im Boden hingewiesen. Er beimpfte durch γ-Strahlen sterilisierte Proben eines Waldbodens mit unterschiedlich artenreichen Sporensuspensionen von Pilzen des gleichen Bodens und stellte fest, dass der durch die Sterilisation des Bodens verfügbar gewordene Kohlenstoff umso intensiver veratmet wurde, je größer die Artenvielfalt im Inokulum war. Diese Beobachtung kann wenigstens zum Teil erklären, warum es in schwermetallbelasteten Waldböden zu einer Anreicherung von organischer Substanz kommt (Coughtrey et al., 1979). Eine Beziehung zwischen mikrobieller Diversität und Abbauprozessen wurde auch von Kjøller und Struwe (1996) diskutiert.

1.2 Ziele dieser Arbeit

Da die Leistungsfähigkeit schwermetallkontaminierter Böden nach den Befunden mehrerer Autoren abnimmt (Burkhardt et al., 1993; Fließbach et al., 1994; Wenderoth und Reber, 1999 a) und Pilze am Kohlenstoffumsatz im Boden zwischen 70 % und 97 % beteiligt sind (Anderson und Domsch, 1975; Blagodatskaya und Anderson, 1998), ist es naheliegend, bei der Er-

forschung der Ursachen dieser Leistungsabnahme nach den Bakterien auch die Pilze zu untersuchen. Dabei ist das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, zu überprüfen, ob bei Pilzen ebenfalls ein bioenergetischer Zusammenhang zwischen katabolischer Vielseitigkeit und Toleranz/Resistenz gegenüber Schwermetallen auf der Artebene sowie der strukturellen Diversität auf der Gemeinschaftsebene besteht. Die Arbeit erfordert also nicht nur die Isolierung und Gruppierung einer großen Zahl von Pilzen zum Zweck der Diversitätsabschätzung, sondern auch die weitere Untersuchung zumindest eines Teils der Isolate im Hinblick auf ihre katabolischen Fähigkeiten und ihre Toleranz/Resistenz gegenüber Schwermetallen.

Die Abnahme der Leistungsfähigkeit von Böden könnte grundsätzlich drei Ursachen haben, auf die Experimente abgestimmt werden müssen. Sie könnte zum einen, wie bei Bakterien festgestellt (Wenderoth und Reber, 1999 a), auf dem Verlust von Fähigkeiten auf der Artebene beruhen und zum anderen, im Sinne von Salonius (1981), auf der Abnahme der Diversität mit der Folge, dass der Gemeinschaft eventuell nicht mehr alle Abbaufähigkeiten zur Verfügung stehen. Sie könnte aber drittens auch darauf zurückgeführt werden, dass unter Schwermetallstress katabolische Enzyme lediglich unterschiedlich gehemmt werden, Fähigkeiten also gar nicht verloren gehen. Schließlich können alle drei Möglichkeiten zutreffen. Zur Überprüfung der ersten Hypothese sind Isolate mindestens einer Art aus belastetem und unbelastetem Boden hinsichtlich ihrer Abbaufähigkeiten zu untersuchen. Hinweise für die Gültigkeit einer Hypothese im Sinne von Salonius (1981) ergäben sich aus Veränderungen im Verhältnis substratspezifischer Vermehrungseinheiten (*colony forming units*, *CFU*) zueinander. Träfen die beiden ersten Hypothesen nicht zu, so könnte die dritte durch Messung substratspezifischer Abbauzeiten an Bodenproben im Respirometer überprüft werden (Wenderoth und Reber, 1999 b). Voraussetzung dazu ist, dass die verschiedenen Testsubstrate, wenn möglich, in äquienergetischen Mengen angeboten werden. Als Testsubstrate sind verschiedene Polymere und hydrophobe Substanzen sowie aromatische Säuren vorgesehen. Die Abbauwege aromatischer Säuren durch Bakterien und Pilze weisen laut Wright (1993) viele Gemeinsamkeiten, aber auch wesentliche Unterschiede auf. Mögliche Abbauwege von Benzoesäure und ähnlichen Substanzen durch Pilze zeigt die Abbildung 1.

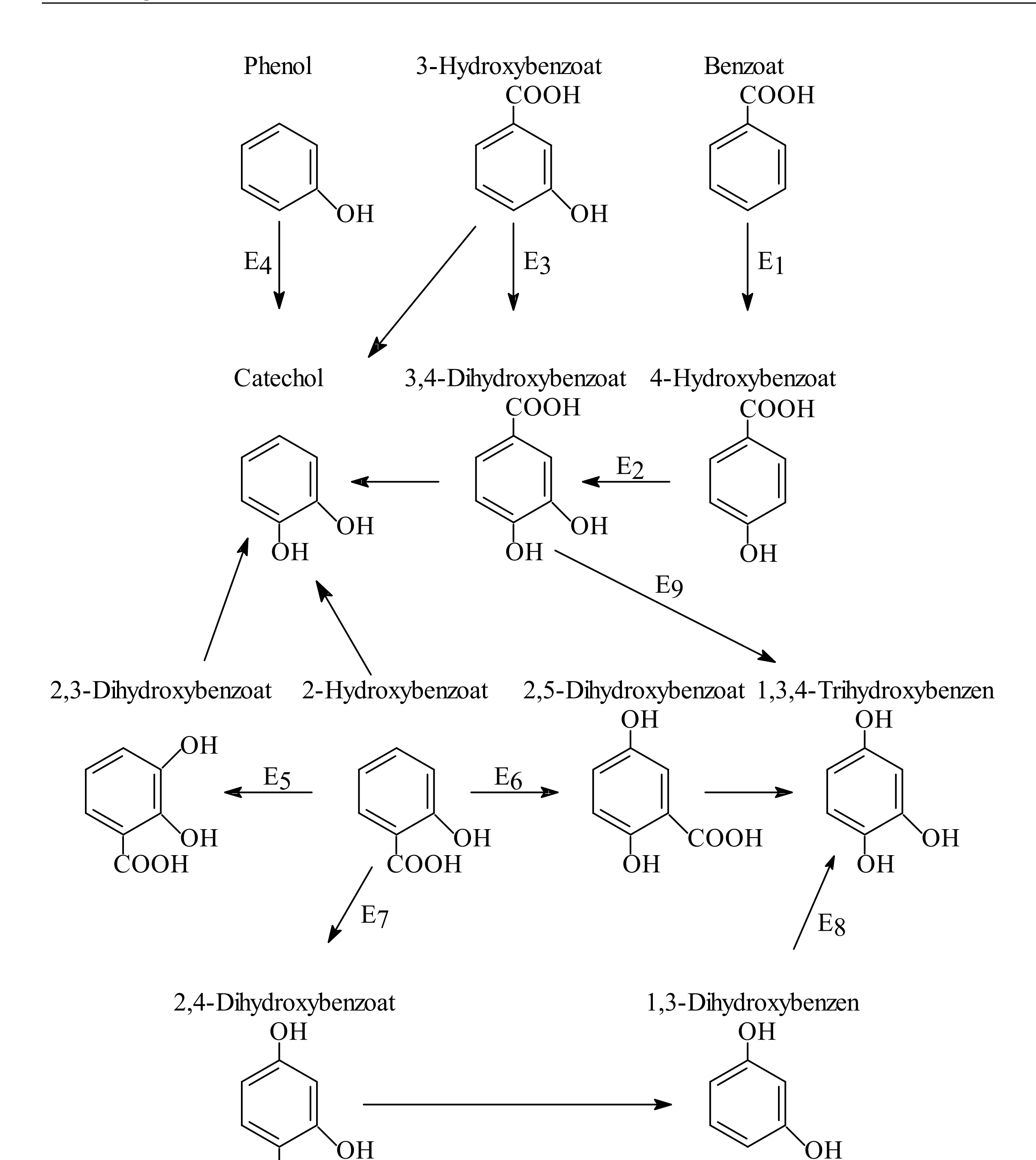
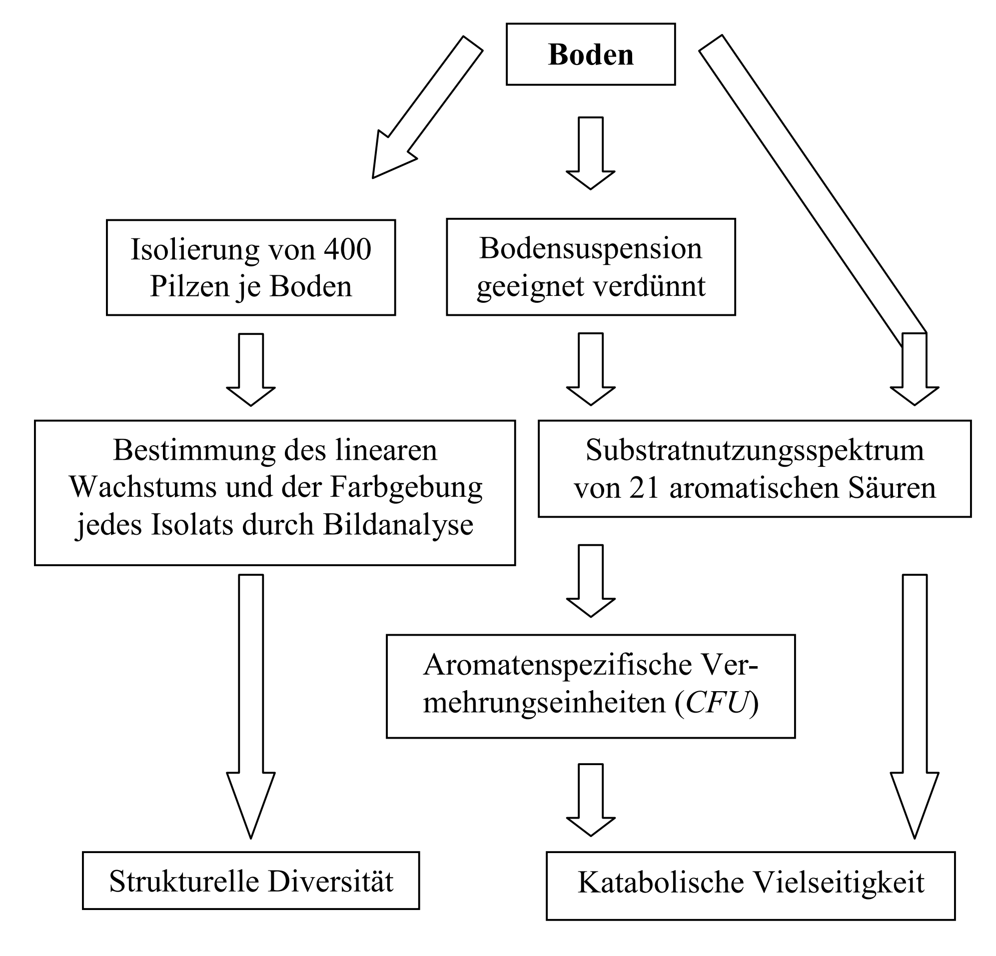


Abb. 1: Abbauwege für den Katabolismus von Benzoat und ähnlichen Verbindungen in Pilzen (nach Wright, 1993). E_1: Benzoat 4-Hydroxylase; E_2: 4-Hydroxybenzoat 3-Hydroxylase; E_3: 3-Hydroxybenzoat 4-Hydroxylase; E_4: Phenol 2-Hydroxylase; E_5: 2-Hydroxybenzoat 3-Hydroxylase; E_6: 2-Hydroxybenzoat 5-Hydroxylase; E_7: 2-Hydroxybenzoat 4-Hydroxylase; E_8: 1,3-Dihydroxybenzen 4-Hydroxylase; E_9: 3,4-Dihydroxybenzoat Hydroxylase.

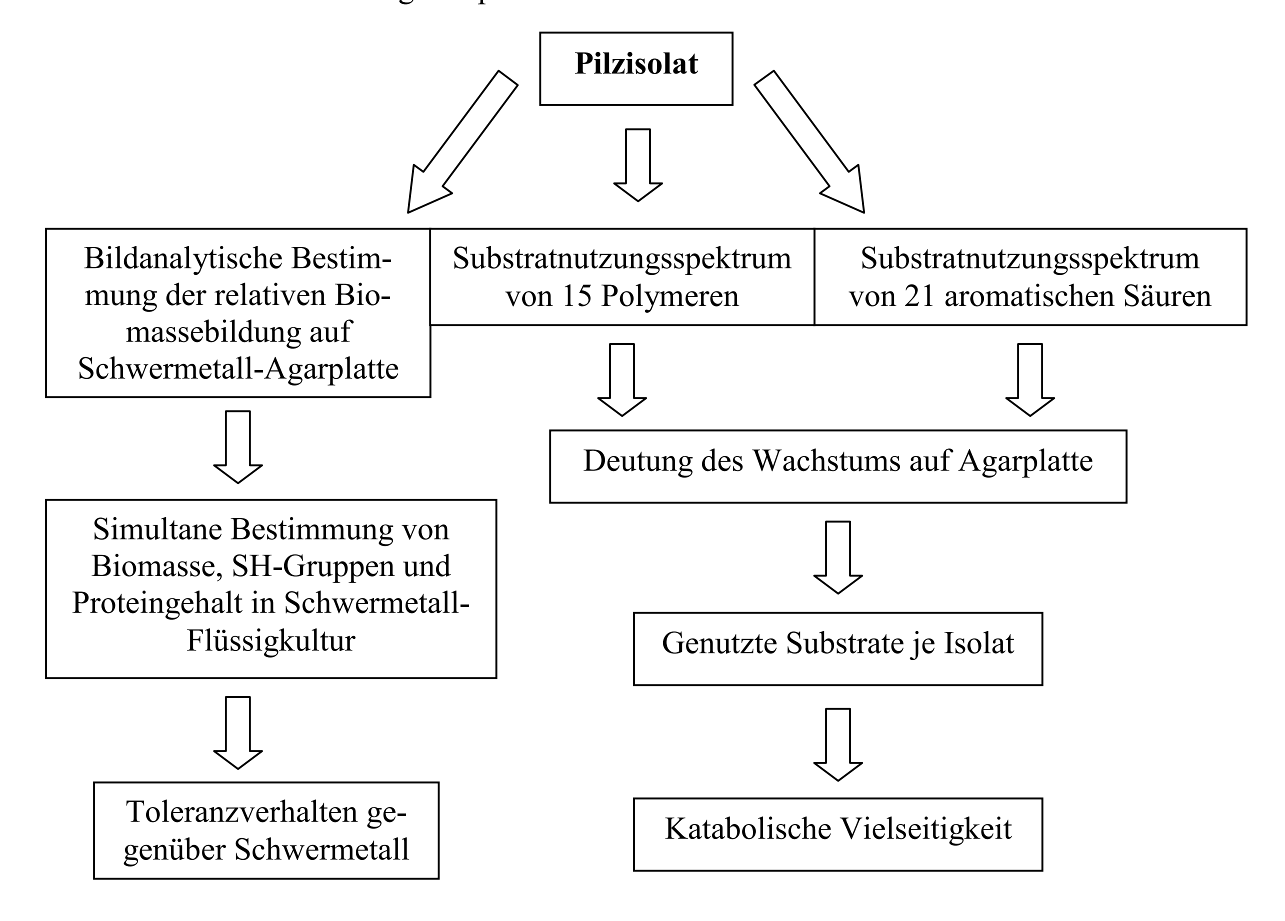
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung bildanalytischer Methoden (Stelzer, 1997) voranzutreiben. Damit sollte es möglich werden, das Wachstum der einzelnen Isolate zu messen und im selben Arbeitsgang Bilddaten zu produzieren, die in einer nachgeschalteten Clusteranalyse (Flury und Riedwyl, 1983; Steinhausen und Langer, 1977) mit dem Ziel verrechnet werden können, die Diversität aller Isolate einer Stichprobe abzuschätzen. Die Entwicklung eines solchen kombinierten Verfahrens aus Bild- und Clusteranalyse scheint deshalb geboten, weil die Abschätzung der Diversität allein schon sehr arbeitsaufwändig ist, in dieser Arbeit aber Schwermetalleffekte nicht nur auf der Gemeinschaftsebene, sondern auch auf der Organismenebene interessieren. Diese Methode würde es auch erleichtern, annähernd identische Pilze aus verschiedenen Isolierungen und Böden in der Stammsammlung für weitergehende physiologische Tests zu finden. Mit der Möglichkeit, simultan Fläche und Dichte (Lichtextinktion) von Pilzkolonien im Durchlicht zu ermitteln und aus dem Produkt beider Größen ein Maß für die relative Biomassebildung abzuleiten, ließe sich die Bildanalyse auch bei der Abschätzung der *in-vitro*-Toleranz/-Resistenz gegenüber Schwermetallen einsetzen.

Isolate gleicher Bildtypen aus belastetem und unbelastetem Boden, die sich bei mikroskopischer Überprüfung als tatsächlich identisch erwiesen haben, sind für weitere physiologische und chemische Untersuchungen vorgesehen. Dabei soll nicht nur ihre katabolische Vielseitigkeit gegenüber aromatischen Säuren und Polymeren sowie hydrophoben Substanzen ermittelt werden, sondern auch ihre Fähigkeit, unter Schwermetallstress mit der Mehrsynthese von Sulfhydryl (SH)-Gruppen zu reagieren. Diese wird als ein Indiz für die Bildung von Metallothioneinen interpretiert. Aufgrund dieser und der bildanalytischen Daten zur Biomassebildung soll geprüft werden, ob eine Lösung für das von Gadd (1986 b; 1989) aufgeworfene Problem, die nicht ausreichende Definition der beiden Begriffe "Schwermetalltoleranz" und "Schwermetallresistenz", gefunden werden kann. Alle in dieser Arbeit durchzuführenden Experimente sind in den Fließschemata 1 und 2 dargestellt.

Fließschema 1: Untersuchung der Testböden.



Fließschema 2: Untersuchung von pilzlichen Reinkulturen.



2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Böden

Die Untersuchungen zur strukturellen Diversität und katabolischen Vielseitigkeit schwermetallgestresster und ungestresster Bodenpilze wurden an vier Böden durchgeführt, die zu zwei Bodenpaaren zusammengefasst wurden. Bodenpaar I bestand aus den beiden am stärksten und am wenigsten mit Schwermetallen belasteten Varianten eines Klärschlamm-versuchs der *Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft* (*FAL*) Braunschweig. Zwischen 1980 und 1990 wurde jährlich eine Menge von 300 m^3 ha^{-1} Klärschlamm (entsprechend 12 t ha^{-1} TM) ausgebracht, seit 1990 nicht mehr. Da der Klärschlamm wenig belastet war, wurde er, um die damals gültigen Grenzwerte für die Bodenbelastung mit Schwermetallen zu erreichen, zusätzlich mit Blei, Cadmium, Chrom, Kupfer, Nickel, Quecksilber und Zink in Mengen von [mg kg^{-1}] 2400, 40, 2400, 2400, 400, 50 bzw. 6000 kontaminiert. Der Kontroll-boden wurde bei diesem Versuch nicht beschlammt, enthielt aber eine Altlast aus einem früheren Versuch. Zum Ausgleich der Düngewirkung des Klärschlamms wurde die Kontrolle aber mit mineralischem N-Dünger (180 kg N ha^{-1} a^{-1}) versorgt. Der Bodentyp beider Versuchsparzellen ist eine Parabraunerde. Die Bodenproben wurden der Rhizosphäre von *Lolium perenne* L. (*Gramineae*) (Schmeil und Fitschen, 1982) entnommen. In mehreren früheren Untersuchungen wurden mikrobiologische Daten über diese Böden zusammengetragen (Chaudri et al., 1993; Fließbach et al., 1994; Wenderoth und Reber, 1999 a; 1999 b).

Bodenpaar II waren Naturböden. Dabei handelte es sich um einen sandigen Waldboden am Rand einer Kiefernschonung nahe Rolfsbüttel, Kreis Gifhorn (52° 24,2' N; 10° 26,0' O; Kontrolle) und einen mit Schwermetallen hochbelasteten, lehmigen Haldenboden (aus Tonschiefer und Grauwacke) der Schachtanlage *Ottiliae* in Clausthal-Zellerfeld (51° 48,3' N; 10° 19,8' O). Letzterer wurde mikrobiologisch schon von Burkhardt et al. (1993) untersucht. Die Bodenproben entstammen der Rhizosphäre von *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. (*Gramineae*) (Schmeil und Fitschen, 1982). Ein lehmiger Kontrollboden, mit ähnlich niedrigem pH-Wert (Tab. 3), war nicht aufzufinden. Der niedrige pH-Wert des lehmigen Haldenbodens ist auf einen hohen Anteil an Sulfiden im Ausgangsgestein zurückzuführen.

Die abiotischen Parameter und Schwermetallgehalte der Böden sind in den folgenden Tabellen 3 und 4 zusammengestellt:

Tab. 3: Abiotische Bodenparameter.

	Bodenpaar I		Bodenpaar II	
Parameter	Acker wb*	Acker b*	Wald ub**	Halde b**
C_{org} [%]	0,79	1,38	n.b.	n.b.
N_t [%]	0,08	0,13	n.b.	n.b.
pH (1 N KCl)	6,02	5,27	3,35	3,43
H_2O [%]	14,8	16,6	16	37

*Bodenpaar I, Ackerböden aus Klärschlammversuch; wb = wenig belastet, b = belastet, Schlammgaben à 300 m^3 ha^{-1} a^{-1} (Fließbach et al., 1994).
**Bodenpaar II, Naturböden; ub = unbelastet, b = belastet, n.b. = nicht bestimmt.

Tab. 4: Schwermetallgehalte der Versuchsböden [mg kg^{-1}].

	Bodenpaar I		Bodenpaar II	
Schwermetall (SM)	Acker wb*	Acker b*	Wald ub**	Halde b**
Cu	15,2	99,5	1,3	42,2
Zn	48,2	345,2	8,3	160
Ni	6,1	21,7	2,3	30,7
Cd	0,2	2,6	0,1	0,2
Pb	n.b.	n.b.	5,1	3037,8
Summe SM (gerundet)	70	469	17	3271

*Bodenpaar I, Ackerböden aus Klärschlammversuch; wb = wenig belastet, b = belastet, Schlammgaben à 300 m^3 ha^{-1} a^{-1} (Fließbach et al., 1994), n.b. = nicht bestimmt.
**Bodenpaar II, Naturböden; ub = unbelastet, b = belastet.

2.1.2 Nährmedien und Lösungen für die Kultivierung von Pilzen

Die im Folgenden aufgeführten Medien und Lösungen wurden bei der Isolierung und Kultivierung der Pilze sowie bei Substratnutzungstests eingesetzt. Die Qualität des Agars wurde dem jeweiligen Verwendungszweck entsprechend ausgewählt. Die Zusammensetzung der Nährböden und Flüssigmedien war der jeweiligen Fragestellung angepasst. Für die Isolierung, bildanalytische Untersuchungen und Schwermetalltests wurde ausschließlich ein leicht modifizierter Nährboden nach Martin (1950) verwendet (Tab. 5).

Tab. 5: Nährboden nach Martin.

▪ Saccharose	10 g
▪ Pepton aus Casein	5 g
▪ KH_2PO_4	1 g
▪ $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,5 g
▪ Fadenagar*	20 g
▪ Spurenelementlösung**	0,5 ml
▪ pH	6,0
▪ Aqua deion.	ad 1000 ml

*Für sämtliche Bildanalyseversuche wurde aus optischen Gründen anstelle des Fadenagars gereinigter Agar (12 g l^{-1}) verwendet.
**Siehe Tabelle 8.

Für die übrigen Medien wurde eine Mineralstoffbasis aus drei Stammlösungen nach Winogradsky (Pochon und Tardieux, 1962) verwendet. Lösung A enthielt nur Di-Kalium-hydrogenphosphat (Tab. 6), Lösung B die übrigen Mineralien (Tab. 7) einschließlich 2,5 % einer Stammlösung von Spurenelementen (Tab. 8). Medien für Substratnutzungstests wurden wie in der Tabelle 9 angezeigt hergestellt.

Tab. 6: Lösung A.

▪ K_2HPO_4	5 g
▪ Aqua bidest.	ad 1000 ml

Tab. 7: Lösung B.

▪ $MgSO_4$	2,5 g
▪ NH_4NO_3	25 g
▪ Spurenelementlösung*	25 ml
▪ Aqua bidest.	ad 1000 ml

*Siehe Tabelle 8.

Tab. 8: Spurenelementlösung.

▪ $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 g
▪ $MnSO_4 \cdot H_2O$	0,2 g
▪ Borsäure	0,1 g
▪ Molybdänsäure	0,1 g
▪ $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,18 g
▪ $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,16 g
▪ HCl	2 mM
▪ Aqua bidest.	ad 1000 ml

Für Substratnutzungstests mit Polymeren und hydrophoben Substanzen wurde der in der Tabelle 9 aufgeführte Mineralsalzagar ohne Substratstammlösung als Trägermedium verwendet. Dabei wurde gereinigter Agar durch Fadenagar (20 g l^{-1}) ersetzt, der das für diesen Test wichtige kryptische Wachstum erlaubt (Kap. 2.2.3.1).

Tab. 9: Medien für Substratnutzungstests.

▪ Lösung A	50 ml
▪ Lösung B	25 ml
▪ Substratstammlösung 200 mM	50 ml
▪ Agar gereinigt	12 g
▪ pH	6,0
▪ Aqua bidest.	ad 1000 ml

2.1.3 Substrate

Die bei Substratnutzungstests mit Isolaten, bei der Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) und bei Atmungsversuchen mit Boden als alleinige Kohlenstoff (C)- und Energiequelle verwendeten aromatischen Säuren sind in der Tabelle 10 aufgeführt. Ebenfalls angegeben ist die Zahl verfügbarer Elektronen, die beim Abbau des Moleküls frei werden sowie die in der Arbeit für jede aromatische Säure verwendete Abkürzung. Diese aromatischen Säuren unterscheiden sich in der Substratqualität für Pilze und werden von diesen, aber auch im Boden, unterschiedlich schnell katabolisiert. In Bodenproben wurden die aromatischen Säuren in fester Form eingerührt, für alle übrigen Untersuchungen wurden 100 mM oder 200 mM Stammlösungen hergestellt.

Die für Substratnutzungstests mit Isolaten verwendeten Polymere und hydrophoben Substanzen sind mit den verwendeten Abkürzungen in der Tabelle 11 aufgeführt. Ebenfalls angegeben sind die Substratkonzentrationen, die sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen hatten. In jedem Fall handelt es sich jeweils um die größtmöglichen am Markt erhältlichen Reinheitsgrade.

2.1.3.1 Aromatische Säuren

Tab. 10: Für Substratnutzungstests mit Isolaten, zur Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) und für Atmungsversuche mit Boden als alleinige C- und Energiequelle verwendete aromatische Säuren.

Aromatische Säure	Abkürzung	Zahl verfügbarer Elektronen pro Molekül
2-Aminobenzoat	2AB	28
4-Aminobenzoat	4AB	28
2,4-Dihydroxybenzoat	2,4DHB	26
2,6-Dihydroxybenzoat	2,6DHB	26
2-Hydroxybenzoat	2HB	28
3-Hydroxybenzoat	3HB	28
4-Hydroxybenzoat	4HB	28
4-Hydroxycinnamat	4HC	38
4-Methoxycinnamat*	4MC	44
Anisat	Anis	34
Benzoat	Benz	30
Cinnamat	Cin	40
Gentisat	Gent	26
Hippurat	Hip	36
Mandelat	Man	34
Nicotinat	Nic	22
Phenylacetat	Phac	36
Phenylalanin	Phal	40
Phthalat	Phth	30
p-Toluat**	pTol	36
Terephthalat	Ter	30
Veratrat	Ver	38

*Ausschließlich als Substrat für Nutzungstests mit Einzelisolaten und zur Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) verwendet.
**Ausschließlich zur Bestimmung aromatenspezifischer Abbauzeiten in Bodenproben verwendet.

2.1.3.2 Polymere

Tab. 11: Für Substratnutzungstests verwendete Polymere und hydrophobe Substanzen.

Polymer/ Hydrophobe Substanz	Abkürzung	Beschreibung	Substratmenge in 20 ml Mineralsalzagar (pH 6,0)
Carragenin	Car	Galactan aus Rhodophyceen	1,25 g; autoklaviert*
Cellulose (Avicel)	Cel	Polysaccharid (Glukose)	5 g; autoklaviert
Celluloseacetat	Celac	Cellulose mit Acetylgruppen (40 %)	0,02 g; zweimal tyndallisiert*
Chitin (Späne)	Chi	Polysaccharid (N-Acetyl-glucosamin)	1,25 g; autoklaviert
Dextran	Dex	Polysaccharid (*Leuconostoc* spp.)	0,2 g; dreimal tyndallisiert
Gellan	Gel	Heteropolysaccharid (*Auromonas elodea*)	0,2 g; zweimal tyndallisiert
Keratin (gemahlen)	Ker	Fibrilläres Protein	4 g; dreimal tyndallisiert
Lecithin	Lec	Phosphatidylcholin, Fettsäurepolymer	1 g; autoklaviert
Ligninsulfonsäure (Ca-Salz)	Lss	Phenylpropangrundkörper des Lignins, in Propanseitenkette sulfoniert	5 g; autoklaviert
Manutex RH	Manu	Polysaccharid, Na-Alginat	1,25 g; autoklaviert
Paraffin	Par	Alkan	1 g; autoklaviert
Rhamsan	Rha	Polysaccharid (*Alcaligenes*)	0,2 g; dreimal tyndallisiert
Tannin	Tan	Polyphenol	2,5 g im Liter; autoklaviert
Xanthan	Xan	Polysaccharid (*Xanthomonas campestris*)	0,2 g; dreimal tyndallisiert
Xylan	Xyl	Polyose aus Xylopyranosen u. anderen Pentosen aus Haferspelzen	1 g; autoklaviert

*Autoklavierung: 20 Min. bei 121 °C. Tyndallisierung: Erhitzung auf 100 °C im Abstand von 24 h.

Die in der letzten Spalte der Tabelle 11 angegebenen Konzentrationen hatten sich in Vorversuchen als optimal für das Erkennen der Substratnutzung durch Testpilze erwiesen. Alle Medien, außer die mit Dextran, Rhamsan und Xanthan, enthielten gereinigten Agar und die in der Tabelle 9 angegebenen Mineralsalze; nur diese drei Substrate wurden ohne Mineralsalze bereitet. Bis auf Tannin (Angabe in g l^{-1}) wurden alle Polymerenmedien in Mengen von 20 ml bereitet und nach dem Sterilisieren in Petrischalen gegossen. Medien mit Cellulose, Celluloseacetat, Chitin, Keratin, Xylan, Lecithin und Paraffin, die letzten beiden nach Homogenisieren mit dem *Ultra Turrax* (TP 18/10, *Janke und Kunkel*, *IKA-Werk* Staufen, Deutschland), wurden in gekühlte Petrischalen (0 °C) gegossen, um vorzeitige Entmischung der Emulsionen zu vermeiden.

2.1.4 Arbeitsplatz für die Bildanalyse

Die bildanalytische Quantifizierung des Pilzwachstums und der Farbkomponenten pilzlicher Kolonien fand an einer Bildanalyseeinrichtung der Firma *Nikon GmbH* (Düsseldorf, Deutschland) statt. Diese Einrichtung setzte sich wie folgt zusammen:

Kamera:
DEI-470 T CCD *Video Camera System*: Kamera, Videosteuerungskasten mit *Keyboard* (*Optronics Engineering*, Goleta, CA, USA).
Objektiv: Mikro *NIKKOR* 60 mm (*Nikon GmbH*, Düsseldorf, Deutschland).

Makrostand:
MacroStand mit integriertem Auf- und Durchlicht (Abb. 2): App. No. 00MSTD2520 (*Synoptics Ltd.*, Cambridge, UK).
Je ein Seitenarmstativ (M-CXL48-50) für Kamera und Auflichtvorrichtung (höhenverstellbar).
Vorhang aus schwarzem Samtstoff zur Fremdlichtabschirmung.
Weiteres Zubehör: Milchglasscheibe; zwei schwarze Probenhalterungen.

Beleuchtungsapparatur:
Auflichtvorrichtung, höhenverstellbar, mit zwei parallel angeordneten Halterungen für Leuchtstoffröhren.

Durchlichtvorrichtung mit vier im Quadrat angeordneten Halterungen für Leuchtstoffröhren, abgedeckt durch Milchglasscheibe.
Leuchtstoffröhren in Tageslichtqualität (5400 K): *OSRAM* L 8W/12-950 *LUMILUX de Luxe* (*Osram GmbH*, München, Deutschland).

Eine Skizze der eingesetzten Bildanalyseapparatur ist in der Abbildung 2 dargestellt.

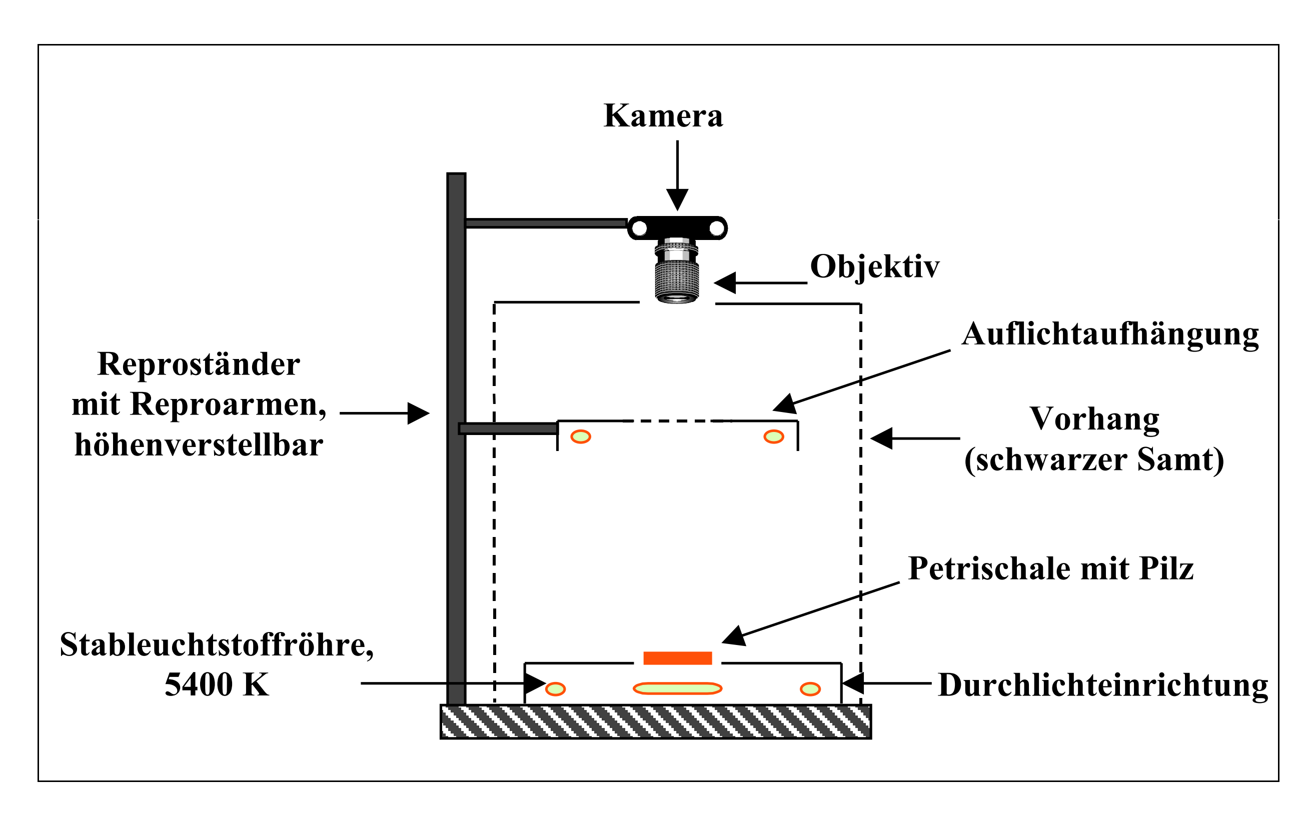


Abb. 2: Bildanalyseapparatur zur Quantifizierung des Pilzwachstums und der Farbkomponenten pilzlicher Kolonien.

Optikstandards:
Grau- und Farbtesttafeln: Art. No. 6817·12095 (*Jobo Labortechnik GmbH*, Gummersbach, Deutschland).
Weißstandard: Milchglasscheibe.
Schwarzstandard: Probenhalterung aus Kunststoff.
Größenstandard: Millimeterpapier.

Rechner:
Pentium (r) 90 MHz, 32 MB RAM mit
Grafikkarte *Magiclib*, Rev. 3.31 (*Matrox Graphics Inc.*, Montreal, Kanada),
Monitor: 19" mit 72 Hz Bildwiederholung,
CD-Brenner.

Software:
Betriebssystem: *DOS*, Version 6.22.
Benutzeroberfläche: *Microsoft Windows 95*, Version 4.00.950 B (*Microsoft Corporation*, Redmond, WA, USA).
Bildanalyseprogramm: *Lucia G*, Version 3.52 a for *Nikon GmbH* (*Laboratory Imaging* (*LIM*), Prag, Tschechische Republik).
Tabellenkalkulations- und Statistikprogramme:
Microsoft Excel, Version 97 SR-2 (*Microsoft Corporation*, Redmond, WA, USA).
Programme für Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse (*PCA*) (Kap. 2.2.2.1.4 u. 2.2.2.1.5):
XLSTAT für *MS Excel*, Version 4.4 (Dr. Thierry Fahmy, Paris, Frankreich).
WinSTAT für *MS Excel*, Version 1999.3 (*R. Fitch Software*, Staufen, Deutschland).
Pirouette, Version 2.0 (*Infometrix Inc.*, Woodinville, WA, USA).
Programme zur Anwendung der *rarefaction*-Methode (Kap. 2.2.4): *ANDI, MOPS* (eigene *DOS*-Programme).

2.1.5 Pilzstämme

Zur Überprüfung der Genauigkeit der während dieser Arbeit weiterentwickelten Bildanalysemethode (Stelzer, 1997) wurden Pilzstämme aus der Sammlung des Instituts für Mikrobiologie der *T.U. Braunschweig* sowie drei Isolate der Art *Penicillium fellutanum* aus den eigenen Isolierungsarbeiten vermessen. Diese Pilze sind mit den verwendeten Abkürzungen in der Tabelle 12 alphabetisch aufgeführt:

Tab. 12: Pilzstämme.

Pilzart	Abkürzung
1. Alternaria sp.	As
2. Aspergillus flavus	Af
3. Aspergillus niger	An
4. Aspergillus ochraceus	Ao
5. Botrytis allii	Ba
6. Cladosporium cucumerinum	Cc
7. Cladosporium herbarum	Ch
8. Eurotium repens	Er
9. Fusarium culmorum	Fc
10. Gliocladium sp.	Gs
11. Hormodendrum violaceum	Hv
12. Hypomyces sp.	Hs
13. Mortierella ramanniana	Mr
14. Mucor flavus	Mf
15. Mucor mucedo	Mm
16. Oidiodendron rhodogenum	Or
17. Paecilomyces lilacinus	Pl
18. Penicillium camemberti	Pc
19. Penicillium funiculosum	Pfu
20. Penicillium fellutanum (Isolat 1)	Pf a
21. Penicillium fellutanum (Isolat 2)	Pf b
22. Penicillium fellutanum (Isolat 3)	Pf c
23. Penicillium notatum (*Fleming*-Stamm)	Pn
24. Scopulariopsis brevicaulis	Sb
25. Stachybotrys chartarum	Sc
26. Trichoderma harzianum	Th
27. Trichoderma viride	Tv
28. Trichothecium roseum	Tr
29. Verticillium cinnabarinum	Vc

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung physikalisch-chemischer Parameter von Bodenproben

Bestimmung des Boden-pH-Werts. Zur Bestimmung des pH-Werts der Böden wurden nach dem Sieben 10 g Boden (TG) mit 20 ml einer 1 N KCl-Lösung in einer PE-Flasche aufgeschwemmt. Nach 30 Min. maschinellen Schüttelns wurde der pH-Wert unter ständigem Rühren mittels einer Glaselektrode (*Labor-pH-Meter 765*, *Knick Elektronische Messgeräte*, Berlin, Deutschland) bestimmt.

Bestimmung der Bodenfeuchte. Proben feuchten Bodens zwischen 4 g und 8 g wurden auf die Trocknungsschale des Feuchtigkeitsmessers (*Ultra X*, UX 2010, *A. Gronert*, Lage,

Deutschland) gegeben und der Strahler auf Stufe 3 eingeschaltet. Nach vollständiger Verdampfung des Bodenwassers durch die Wärmestrahlung (Gewichtskonstanz) wurde die Feuchtigkeit des Bodens vom Gerät in Prozent mit einer Nachkommastelle angegeben.

Bestimmung der Schwermetallgehalte von Bodenproben. Die Schwermetallgehalte der Böden wurden nach *Königswasseraufschluss* (Schlichting et al., 1995) durch Messung im Atomabsorptionsspektralphotometer (AAS) bestimmt (*VARIAN* GTA 100, Spectr AA·200, Darmstadt, Deutschland). Nach der Trocknung (24 h, 105 °C) wurden die Proben (1 g, TG) gemörsert und 1 h bei 450 °C im Muffelofen verascht. Anschließend wurden die Proben mit 6 ml 38 % HCl und 2 ml 65 % HNO_3 versetzt und auf einem Sandbad bei 100-105 °C für 2 h vorsichtig erhitzt. Nach Resuspendierung in 2 M HNO_3 und Filtration durch einen säurefesten Filter (*S & S 595 ½*, *Schleicher und Schüll*, Dassel, Deutschland) wurde das Extraktionsvolumen mit 2 M HNO_3 auf 50 ml aufgefüllt. Für die Bestimmung wurden die Proben in 100 ml PE-Flaschen überführt. Die Gehalte an Ni, Cu, Pb und Cd des Waldbodens sowie Cd des Haldenbodens wurden über Graphitrohrtechnik-AAS, die Gehalte an Ni, Cu, Pb und Zn des Haldenbodens sowie Zn des Waldbodens über Flammentechnik-AAS ermittelt. Die Extraktionsgehalte der Schwermetalle wurden in mg l^{-1} ausgegeben.

2.2.2 Untersuchung von Pilzgemeinschaften: Diversität und Leistungsfähigkeit

2.2.2.1 Abschätzung der Diversität

2.2.2.1.1 Vorbehandlung von Bodenproben für mikrobiologische Untersuchungen

Nach der Entnahme (Tab. 13) wurden die Bodenproben so angetrocknet, dass sie leicht zu sieben waren. Dazu wurden Kunststoffsiebe der Maschenweite 4 mm verwendet. Nach Sieben, Homogenisieren, pH- und Feuchtigkeitsbestimmung wurden sie in Kunststoffbeutel mit Wattestopfen zur Sicherstellung genügenden Gasaustauschs etwa acht Wochen bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) vorinkubiert. Wie noch unveröffentlichte Ergebnisse (Wenderoth und Reber) zeigen, bewirkt diese Äquilibrierung eine Art Klimaxstadium, bei dem leicht verfügbare Substrate abgebaut sind, die substratinduzierte Atmung (*SIR = substrate induced respiration*) einen Minimalwert und katabolische Vielseitigkeit sowie Diversität der Bodenmikroorganismen einen Maximalwert erreicht haben. Dieser Zustand, der nach 4-8 Wochen Inkubationszeit eintritt, ist für Diversitätsanalysen und bodenphysiologische Tests wegen seiner

Reproduzierbarkeit optimal geeignet. Falls mit den entsprechenden Untersuchungen nicht sofort begonnen werden konnte, wurde der Boden bei 4 °C im Kühlraum dunkel gelagert. In diesem Fall wurden Proben einen Tag vor Respirationsversuchen mit Boden auf 20 °C temperiert.

Tab. 13: Zeitpunkte der Probenahmen und der Isolierungen.

Bodenstichprobe	Probenahme	Ausplattierung
Acker wb1*	März 1999	Mai 1999
Acker b1*	März 1999	
Acker wb2*	März 1999	Dezember 1999
Acker b2*	März 1999	
Acker wb3*	April 2000	August 2000
Acker b3*	April 2000	
Wald ub1*	Januar 1999	Februar 1999
Halde b1*	Oktober 1998	
Wald ub2*	Januar 1999	August 1999
Halde b2*	Januar 1999	
Wald ub3*	Oktober 1999	März 2000
Halde b3*	Oktober 1999	

*wb = wenig belastet, b = belastet, ub = unbelastet.

2.2.2.1.2 Isolierung, Kultivierung und Stammhaltung von Pilzisolaten

Isolierung. Je 10 g Boden (TG) wurden in 100 ml Natriumhexametaphosphatlösung (1 g l^{-1}) aufgeschwemmt und 30 Min. maschinell geschüttelt. Die Bodensuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit Ringerlösung (1 Tablette 500 ml^{-1} H_2O, entsprechend 2,25 g NaCl, 0,105 g KCl, 0,08 g $CaCl_2$, 0,01 g $NaHCO_3$, 0,105 g NH_4Cl, pH 6,9) verdünnt. Diejenige Verdünnungsstufe wurde verwendet, mit welcher ca. 5-10 Pilze pro Petrischale isoliert werden konnten (Vorversuch). Je nach Bodentyp lag die optimale Verdünnung bei 10^{-4} oder 10^{-5}. Nur solche Platten, auf denen die Pilze gut getrennt wuchsen, wurden ausgewählt. Dies sollte sicherstellen, dass schnellwüchsige Pilze gegenüber langsameren Pilzen nicht im Vorteil waren bzw. bevorzugt wurden, um eine Verfälschung der Pilzdiversität möglichst auszuschließen.

Zur Anzucht der Pilze wurde 1 ml der geeigneten Bodensuspension in eine Petrischale gegeben und nach dem *Koch'schen Plattenguss* mit 10 ml, auf 45 °C abgekühltem, Nährmedium (Tab. 5) vermengt. Dem abgekühlten Nährmedium wurde als Antibiotikum 300 mg l^{-1}

Streptomycinsulfat zugesetzt. Nach Festwerden des Mediums wurden die Petrischalen invertiert und bei 25 °C inkubiert. Die heranwachsenden Pilze wurden im Verlauf der folgenden Tage mittels Impfspatel isoliert und auf Schrägagarröhrchen (6 ml, gleiches Medium, ohne Streptomycinsulfat) zwecks Stammhaltung überimpft.

Kultivierung der Pilze. Exakt 20 ml Nährmedium (Tab. 5), welches unter Verwendung von gereinigtem, optisch klarem Agar hergestellt worden war, wurden in eine sterile Kunststoffpetrischale mit Nocken (*C. A. Greiner & Söhne GmbH*, Kremsmünster, Österreich, 8,6 cm ∅) gegeben. Diese Schalen bieten für bildanalytische Untersuchungen gegenüber Glaspetrischalen den wesentlichen Vorteil der optischen Einheitlichkeit. Zur Vermeidung von störenden Nachbarkolonien, die durch streuende Sporen während des Animpfvorgangs verursacht werden können, wurden sporulierende Pilze mittels Sporensuspension, die jeweils mit steriler Prillösung (0,004 %) in einem *Eppendorf*-Reaktionsgefäß (1,5 ml) angesetzt wurde, angeimpft. Hierzu wurden 10 µl Suspension in die Schalenmitte pipettiert (Schablone). Zu gering oder gar nicht sporulierende Pilze wurden durch ein kleines quadratisches Myzelstück angeimpft, das dem Rand einer Vorkultur mittels Skalpell entnommen worden war.

Beimpfte Petrischalen wurden in einem Brutraum bei 22 °C inkubiert. Die Platten wurden invertiert in einem Regal auf Styroporplatten und in gleicher Höhe ausgelegt, um starke Kondenswasserbildung im Schalendeckel zu verhindern bzw. um eine absolut identische Inkubationstemperatur zu gewährleisten. Gegen zu starke Austrocknung wurden die Platten mit transparenter Kunststofffolie abgedeckt.

Um die Sporulierung der Pilze während der Inkubationszeit anzuregen, wurden die beimpften Petrischalen mit Schwarzlicht (*OSRAM* L 36 W/73 568; *SYLVANIA Blacklight-Blue* F 36 W-BLB) in einstündigem Wechsel (Zeitschaltuhr) bestrahlt. Laut Hersteller (*Osram GmbH*, München, Deutschland) emittieren die Leuchtstoffröhren ausschließlich langwelliges UV-Licht (300-400 nm), das für das Auge unschädlich ist. Die Leuchtstoffröhren waren 75 cm über den Kulturen angebracht, um zu starker Wärmeentwicklung vorzubeugen.

Stammhaltung. Jeder isolierte Pilz wurde auf ein Schrägröhrchen überimpft. Dieses enthielt 6 ml Nährmedium (Tab. 5), welches mit Fadenagar ohne Streptomycinzusatz angesetzt wurde. Das Röhrchen wurde mittels Wattestopfen verschlossen und bei 25 °C inkubiert. Nach etwa drei Tagen erfolgte die Überprüfung der Reinheit. Reinkulturen wurden fortlaufend nummeriert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Zur Vermeidung von Infektionen wurden die Röhrchenständer in Kunststofftüten verwahrt. Nach Bedarf wurden Pilze auf neue Stammröhrchen überimpft, um z.B. genügend Impfmaterial zur Verfügung zu haben.

Isolate, die aufgrund der Diversitätsuntersuchungen in beiden Proben eines Bodenpaars vorkamen und für weitergehende Untersuchungen vorgesehen waren, mussten noch besser vor Kontamination, z.B. durch Milben, geschützt werden als die Arbeitsstammkulturen. Zu diesem Zweck wurden etwa fünf Myzelstücke in 5 ml sterilem destilliertem Wasser in Schraubglasröhrchen (10 cm) bei 4 °C aufbewahrt. Die Myzelstücke wurden aus dem Randbereich von Kolonien mittels Skalpell ausgeschnitten. Diese Art der Konservierung ist laut Angaben von Frau Dr. Lang (persönliche Mitteilung) gängige Praxis in der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (*DSMZ*, Braunschweig).

2.2.2.1.3 Bildanalyse

Die oben genau beschriebenen Bedingungen der Anzucht von Pilzen sind wichtig für die absolute Reproduzierbarkeit von Bilddaten, mit deren Hilfe in dieser Arbeit große Zahlen von Bodenisolaten zum Zweck der Diversitätsabschätzung gruppiert werden.

Kalibration des Bildanalysesystems. Vor dem Einsatz des Bildanalysesystems musste dieses unter Verwendung von Farb- und Flächenstandards im Auflicht nach Vorschrift des Programmherstellers kalibriert werden, um reproduzierbare Messbedingungen, v.a. bezüglich der Lichtqualität, gewährleisten zu können. Dazu wurden die Systemeinstellungen verwendet, die sich auch bei der Vermessung der Pilzkolonien bewährt hatten, wie z.B. ein Kameraabstand von 68 cm, eine Blende des Objektivs von 5,6 und eine Belichtungszeit der Kamera von 1/50 Sek. (Auto). Auf die ausführliche Darstellung der einzelnen Kalibrationsabläufe wurde im Folgenden verzichtet, da diese, je nach verwendetem Programm, variieren können.

Eine metrische Kalibration war erforderlich, um das lineare Wachstum einer Pilzkolonie real messen zu können. Ziel war es, die gemessene Größe nicht in Bildpunkten (*Pixel*), sondern, wie zur Vermessung der Pilze nötig, in Millimetern [mm] auszudrücken. Als Kalibrierstandard diente Millimeterpapier. Als Standard für den Schwarzabgleich wurde eine mattschwarz lackierte Kunststoffplatte verwendet, die auf der Bildebene plaziert wurde. Der Weißabgleich wurde mit der Milchglasscheibe als Standard auf der Bildebene durchgeführt. Die Kalibration des Systems hinsichtlich Farbigkeit (*Density*) und Helligkeit (*Brightness*) erfolgte mittels Farbtesttafeln (*Jobo Labortechnik GmbH*, Gummersbach, Deutschland) der Farben Rot, Grün, Blau, einigen Grautönen sowie Schwarz und Weiß, die ebenfalls auf der Bildebene positioniert werden mussten. Sämtliche Kalibrationen wurden vom Programm ge-

speichert. Beispieldaten erfolgter Kalibration (*Value*) der Helligkeit und Farbigkeit zeigt die Tabelle 14.

Tab. 14: Helligkeits- und Farbigkeitswerte nach erfolgter Kalibration.

	Helligkeit		Farbigkeit	
Referenztafel	*Value*	*Brightness*	*Value*	*Density*
1. schwarz	68	10	66	10
2. blau	78	9	77	9
3. grau a	88	8	88	8
4. grau b	126	7	126	7
5. grün	133	6	134	6
6. rot	206	5	205	5
7. grau c	235	2	234	2
8. weiß	255	0	255	0

Messfunktionen. Unter Verwendung folgender parametrisierter Messfunktionen aus dem Bildanalyseprogramm *Lucia* wurden die Pilze in ihrem Wachstum und ihrer Farbgebung vermessen:

Equivalent Diameter (equivalenter Durchmesser): Nach erfolgter metrischer Kalibration des Bildanalyseprogramms kann der equivalente Durchmesser [mm] einer Pilzkolonie nach der Formel (1)

$$\sqrt{\frac{4 \times \text{Fläche}}{\pi}} \qquad (1)$$

gemessen werden. Über den davon abgeleiteten Radius ist es bei zeitlich versetzten Messungen möglich, die lineare Wachstumsgeschwindigkeit in mm d^{-1} zu bestimmen. Die Fläche (*Area*) dient als Hauptkriterium der Größe, wobei die unkalibrierte Fläche die Zahl der Bildelemente (*Pixel*), die kalibrierte Fläche dagegen die Realfläche angibt. Wird die Koloniefläche nicht direkt über die Funktion *Area* (Fläche) ermittelt, so ist es auch möglich, unter Verwendung des Radius die Koloniefläche über die Formel der Kreisfläche (2)

$$A_{\text{Kreis}} = \pi \times r^2 \qquad (2)$$

zu berechnen.

Mean Gray (Grauwert): Durch diese Funktion wird der durchschnittliche Grauwert (Intensität) des Messobjekts bestimmt. In der Standardeinstellung vergibt das Programm relative Werte von Null bis 255. Wenn nötig, kann dieser maximale Messbereich eingeschränkt wer-

den. Darauf wurde in dieser Arbeit verzichtet, um die gesamte Variabilität der Intensitäten erfassen zu können.

Mean Red (Rot), *Mean Green* (Grün), *Mean Blue* (Blau): Die Auswahl dieser drei Funktionen ermöglicht die Messung der durchschnittlichen Intensitäten der Rot-, Grün- und Blautöne des Objekts. Die relativen Messbereiche gleichen dem des Grauwerts. Sind laut Definition die Messwerte für Rot, Grün und Blau gleich Null, so ist das Objekt schwarz, bei einem maximalen Wert von 255 ist das Objekt weiß.

Hue Typical (typische Farbenabstufung): Diese Funktion stellt in einem gedachten Farbdreieck von Rot, Grün und Blau einen Punkt, den typischen Farbmischwert (Farbton, *hue*) dar, der von der Intensität der Anregung der drei Sensoren für *RGB* durch das eingestrahlte Licht abhängt. Auch hier werden relative Werte zwischen Null und 255 vergeben.

Mean Saturation (Sättigung): Diese Funktion gibt den statistischen Durchschnitt aus den Werten der Farbsättigung mit den Extremen Null und 255 wieder.

Mean Brightness (Helligkeit): Der Durchschnitt der Helligkeitswerte. Die Messwertangabe erfolgt als Dezimalzahl.

Mean Density (Farbdichte): Der Durchschnitt aller Werte für die Farbdichte des Objekts. Messwerte liegen als Dezimalzahlen vor.

Gray Variation (Variation des Grauwerts): Die Variation des Grauwerts (Intensität) ist aus einem Intensitätshistogramm abgeleitet. Sie kommt der gewöhnlichen Standardabweichung der Intensitätswerte gleich, wird in Dezimalzahlen ausgedrückt und ist die Basis für die Berechnung von *Mean Gray*.

Bright Variation (Variation der Helligkeit): Die Standardabweichung der Helligkeitswerte, in Form von Dezimalzahlen wiedergegeben.

Density Variation (Variation der Farbdichte): Die Standardabweichung aller Werte für die Farbdichte des Objekts, ebenfalls als Dezimalzahlen vorliegend.

Bis auf die drei eine Variation beschreibenden Messfunktionen *Gray Variation*, *Bright Variation* und *Density Variation*, wurden alle Farbfunktionen zur Vermessung der Unter- und Oberseite einer Pilzkolonie angewendet. Die Variationsfunktionen wurden ausschließlich zur näheren Beschreibung der Kolonieunterseite herangezogen, da die Pilze auf der Unterseite meist weniger differenziert sind als auf der Oberseite. Die Clusterung von Probedaten hatte gezeigt, dass die Anwendung der oben aufgeführten Messfunktionen zu dem besten Differenzierungsergebnis führte (nicht dargestellt). Die Kolonieoberseite wird durch insgesamt acht

und die Kolonieunterseite durch elf Farbparameter beschrieben. Einschließlich des Wachstumsparameters wird also jedes Isolat durch 20 Parameter charakterisiert.

Wachstums- und Farbmessungen mit dem *Lucia* Bildanalyseprogramm. Generell wurden die Pilze in ihrem Wachstum im Durchlichtmodus vermessen. Die Farbmessungen wurden dagegen ausschließlich im Auflichtmodus ausgeführt, da die Farbgebung von Ober- und Unterseite eines Objekts nur im Auflicht getrennt werden kann. Zur Vermeidung einer Kontamination während der siebentägigen Inkubationszeit durfte der Schalendeckel für die Wachstumsmessung nicht entfernt werden. Aufgrund manchmal nicht unerheblicher Kondenswasserbildung im Schalendeckel wurde das Wachstum deshalb anhand der Kolonieunterseite gemessen. Der Wachstumsstart wurde generell auf 24 h nach dem Animpfen festgelegt, gleichgültig, ob die Beimpfung über ein Myzelstück oder eine Sporensuspension erfolgte. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit erfolgte die zweite Messung des Koloniewachstums 2-4 Tage nach dem Anwachsen. Am sechsten Tag erfolgte die Farbmessung der Unterseite mit geschlossenem Schalendeckel, die der Oberseite nach Entfernen des Schalendeckels, um Strukturen besser darstellen zu können. Im Gegensatz zur Wachstumsmessung wurden für die Farbmessungen digitale Bilder aufgenommen. Dies ermöglichte die Erhebung der Messdaten zu einem späteren Zeitpunkt sowie eine subjektive Überprüfung der nach der Clusteranalyse (Kap. 2.2.2.1.4) der Bilddaten zu Alben zusammengefassten Bilder.

Wachstumsmessungen erfolgten immer mit der höchsten Kameraposition (68 cm), bei der die Petrischale als Ganzes auf dem Monitor bzw. Messfeld abgebildet war. Diese Position war durch den Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche definiert. Für die Farbmessungen hatte es sich als sinnvoll erwiesen, jedes Pilzisolat als großformatiges Portrait darzustellen, um möglichst genau Details der Morphologie und der Farbgebung bildanalytisch erkennen zu können. Hierfür wurde eine mittlere Kameraposition von 36 cm gewählt.

Die mittlere Kameraposition stellte für die Farbmessung einen Kompromiss dar, weil eine Abhängigkeit der Licht- bzw. Farbqualität vom Kameraabstand festgestellt wurde, so dass Isolate gleicher Arten im Grenzbereich zweier Kameraabstände nicht als identisch erkannt würden. Außerdem war nur in dieser Position gewährleistet, dass auch bei kleinen Kolonien Strukturen noch gut zu erkennen waren. Da große oder ausgewachsene Pilze nur ohne den äußeren Randbereich der Kolonie aufgenommen werden konnten, wurden diese zusätzlich mit der oberen Kameraposition aufgenommen.

Vermessung optisch dichter Pilze. Optisch dichte Pilze sind im Durchlicht leicht vor dem hellen Hintergrund des Nährbodens zu erkennen und daher bildanalytisch auch einfach zu vermessen. Vor der eigentlichen Vermessung ist es notwendig, das zu vermessende Objekt zu segmentieren. Die sogenannte Segmentierung trennt durch Auflage von Bildmasken und Anwendung von Programmfiltern den zu vermessenden Bereich des Bildes vom übrigen Bildbereich. Erreicht wird dies durch Definition eines Schwellenwerts für die Farben Rot, Grün und Blau (*RGB*). Durch den Vorgang des Segmentierens werden alle Bildelemente eliminiert, die nicht zu der zu vermessenden Pilzkolonie gehören. Nach Invertierung kann die im Binärmodus weiß dargestellte Kolonie in den zuvor ausgewählten Parametern vermessen werden. Der gesamte Ablauf der Vermessung optisch dichter Pilze kann in Form eines Makros aufgenommen, gespeichert und ausgeführt werden.

Vermessung von Pilzen geringer optischer Dichte. Pilze geringer optischer Dichte sind im Myzelwuchs weniger stark verzweigt als optisch dichte, oft pigmentlos und können deshalb Licht schlecht absorbieren. Die Folge ist, dass diese Pilze im Durchlicht aufgrund der geringen Extinktion von der Kamera nur schlecht in ihrer Größe erkannt werden. Dies erschwert sowohl Wachstums- als auch Farbmessungen.

Ein solches Isolat muss generell im Auflicht vermessen werden. Zur Kontrasterhöhung wurde der helle Untergrund durch einen mattschwarz lackierten Hintergrund ersetzt. Im Gegensatz zur Vermessung im Durchlicht konnte nicht über die homogen weiße Umgebung der Kolonie segmentiert werden. Hier war es notwendig, die Kolonie selbst an mehreren Punkten des Randbereichs zu markieren. Der bisher segmentierte Bereich wurde mit Hilfe der Bildmaske sichtbar. Es galt, die Segmentierung so lange fortzusetzen, bis der Kolonierand geschlossen segmentiert vorlag. Durch verschiedene Befehle des Programms konnte die teilweise segmentierte Kolonie mit der Maske ausgefüllt und auch im Randbereich geglättet werden. Darüber hinaus konnten angrenzende, fehlsegmentierte Maskenbereiche weggeschnitten und das Segmentierungsergebnis durch eine Konturfunktion in seiner Richtigkeit überprüft werden. Dabei war zu beachten, dass die Maske der Kolonie in keiner Verbindung zu dem Randbereich des übrigen Bildes stand, da diese Bereiche sonst mit in die Messung eingeflossen wären. Entsprach der segmentierte Bildbereich der realen Kolonie, wurde diese ebenfalls im Binärmodus vermessen.

Messung von Farben. Für die Farbmessung im Auflicht galt der Segmentierungsablauf zur Vermessung von Pilzen geringer optischer Dichte. Jedes gespeicherte Bild der Pilzunter- und Oberseite wurde im programmeigenen *LIM*-Format (*Laboratory Imaging*) verlust-

frei komprimiert und hat eine Größe von etwa 800 KB. Die zunächst auf der Festplatte des Rechners gespeicherten Bilder wurden auf CD kopiert und von dort, je nach Bedarf, für die Farbmessung abgerufen. Für die separate Vermessung der Unter- und Oberseite jedes Pilzes wurden die im Abschnitt *Messfunktionen* beschriebenen Parameter vor jeder Messung aufgerufen:
Unterseite: *Mean Gray*, *Mean Red*, *Mean Green*, *Mean Blue*, *Hue Typical*, *Mean Saturation*, *Mean Brightness*, *Mean Density*, *Gray Variation*, *Bright Variation*, *Density Variation*.

Oberseite: *Mean Gray*, *Mean Red*, *Mean Green*, *Mean Blue*, *Hue Typical*, *Mean Saturation*, *Mean Brightness*, *Mean Density*.

Pilze, die zum Zeitpunkt der Bildaufnahme (7 d nach Animpfen) den Petrischalenrand erreicht hatten, ließen sich nicht mehr wie beschrieben segmentieren. Um dennoch die Farben dieser Isolate messen zu können, wurde ein Kreis definierter Größe (Sonde) aufgezogen, innerhalb dessen die Farben des Pilzes gemessen werden konnten. Der Messkreis wurde von der Schalenmitte her aufgezogen und endete kurz vor dem Rand der Schale. Über eine Hilfsmarkierung auf dem Monitor konnte die Größe des Messkreises reproduziert werden.

2.2.2.1.4 Clusteranalyse der Bilddaten

Die 19 Farbrohdaten und der aus der Größenmessung abgeleitete Wert für das lineare Wachstum [mm d^{-1}] waren für die Auffindung von Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Pilzisolaten vorgesehen. Diesem Zweck diente eine Clusteranalyse (Flury und Riedwyl, 1983; Steinhausen und Langer, 1977). In der Regel beruht die Clusteranalyse (Cluster = Gruppe) auf der Gleichbehandlung aller Daten und wurde auch so angewendet. Die Ähnlichkeiten zwischen den Isolaten wurden in Form eines Dendrogramms ausgegeben, das einer Art Verwandtschaftsstammbaum entspricht und auf einem hierarchischen (binären) Einteilungsprinzip beruht. Mit geringen Abweichungen arbeiten die drei eingesetzten Programme nach diesem Prinzip. Für die Auswahl des in dieser Arbeit eingesetzten Programms stand weniger die Visualisierung des Verwandschaftsgrads zwischen den Isolaten als *similarity*, *Distanz* oder *index* im Vordergrund als vielmehr die Leistungsfähigkeit und Bequemlichkeit der Handhabung. Wegen seiner geringen Kapazität (maximal 85 Isolate je Dendrogramm) schied das *MS-Excel-Add-In*-Programm *XLSTAT* (Version 4.4) von vornherein aus. Das Programm

Pirouette war zwar sehr leistungsfähig, lieferte aber bei einer vergrößerten Darstellung (zur Identifizierung der optimalen Clusterebene) nur Ausschnitte des Dendrogramms. Eine große Kapazität, verbunden mit der Möglichkeit, das gesamte Dendrogramm zu vergrößern, hat nur das Programm *WinSTAT* (ebenfalls ein *Excel-Add-In*) aufzuweisen, das die Clusteranalyse nach der *Ward*-Methode (*incremental sums of squares*; Beneke und Schwippert, 1999; Ward, 1963) durchführt und Ähnlichkeiten als *Distanz* ausgibt. In dieser Arbeit wurde für die Clusteranalyse daher ausschließlich *WinSTAT* eingesetzt. Die Clusteranalyse liefert unterschiedlich große Gruppen von Bildtypen (entsprechend Arten, falls diese bestimmt werden), die in die Berechnung ökologischer Indices eingehen (Kap. 2.2.4).

2.2.2.1.5 Beurteilung der Unterscheidungskraft der in der Bildanalyse eingesetzten Messparameter durch Hauptkomponentenanalyse

Ein Messparameter, der sich aufgrund seiner spezifischen Messwerte von anderen Parametern stark unterscheidet, d.h. mit diesen nicht korreliert ist, findet bei zweidimensionaler Darstellung in der Hauptkomponentenanalyse einen von anderen Parametern deutlich abweichenden Platz. Umgekehrt nehmen stark korrelierte Parameter eine gleiche oder ähnliche Position ein. Diese Analyse wurde auf die bei der Bildanalyse erhaltenen Daten nicht nur mit dem Ziel angewendet, die Unterscheidungskraft der einzelnen Messparameter zu beurteilen, sondern auch die Tauglichkeit der Bildanalysedaten für die Unterscheidung der verschiedenen Isolate zu bewerten. Für diese Untersuchungen wurde das Programm *XLSTAT* (Kap. 2.1.4) mit den Einstellungen *Classical* und *Correlations* eingesetzt.

2.2.2.2 Abschätzung der Leistung von Pilzgemeinschaften im Boden

2.2.2.2.1 Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten von Pilzen

Zur Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU* = *colony forming units*) wurden 21 aromatische Säuren als einzige C- und Energiequelle in einer Konzentration von 10 mM in eine Mineralsalzlösung mit gereinigtem Agar (Tab. 9) eingearbeitet. Diese aromatischen Säuren (Tab. 10) haben unterschiedliche Substratqualitäten und können von Pilzen und im Boden verschieden schnell als C- und Energiequelle genutzt werden. Genau

1 ml einer geeigneten Verdünnungsstufe der jeweiligen Bodensuspension (Kap. 2.2.2.1.2) wurde mit verflüssigtem Agarmedium (45 °C) vermischt (*Koch'scher Plattenguss*). Die geeignete Verdünnungsstufe variierte von Aromat zu Aromat; sie musste so gewählt werden, dass die heranwachsenden Kolonien gut zählbar waren. Als Kontrollen wurden ein Vollmedium (Tab. 5) und Mineralsalzagar (Tab. 9) verwendet, mit dem Ziel, sowohl kräftiges als auch kryptisches Wachstum identifizieren zu können. Die erstarrten Platten wurden invertiert bei 25 °C inkubiert und nach 14 Tagen ausgewertet. Die Daten dienen der Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit auf der Gemeinschaftsebene (Kap. 2.2.4).

2.2.2.2.2 Bestimmung aromatenspezifischer Abbauzeiten in Bodenproben

Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass Aromaten aufgrund ihrer Molekülstruktur unterschiedlich schnell abgebaut werden können. Daher müssen die Abbauzeiten, d.h. die Inkubationszeiten zwischen Substratzugabe und Erscheinen des betreffenden Atmungsgipfels, bei Applikation äquienergetischer Mengen unterschiedlich lang sein. Da der Anteil der Pilze an der Atmungsaktivität mindestens 70 % beträgt und mit zunehmendem Stress sogar weiter zunimmt (Anderson und Domsch, 1975; Blagodatskaya und Anderson, 1998; Schlegel, 1992) wird davon ausgegangen, dass durch Messung der Bodenatmung weitgehend die Pilzgemeinschaft erfasst wird.

Die Berechnung äquienergetischer Substratmengen beruhte auf der Zahl der Elektronen, die beim Abbau eines Moleküls fließen können (verfügbare Elektronen; Payne, 1970). Als Bezugssubstrat diente 4-Hydroxybenzoesäure (28 Elektronen). Substrate mit einer höheren Zahl verfügbarer Elektronen mussten in entsprechend geringerer Konzentration appliziert werden. Die eigentliche Applikationsmenge hatte sich nach der Empfindlichkeit des Respirometers zu richten. Das verwendete Gerät registrierte den CO_2-Ausstoß der Bodenproben mit Hilfe eines Infrarot-Gas-Analysators (Heinemeyer et al., 1989). Bei Einsatz eines leicht abbaubaren Substrats und eines Belüftungsstroms von 150 ml min^{-1} durfte der Messbereich des Geräts nicht übertroffen werden. Für das Bezugssubstrat war dies eine Menge von 75 µmol, die 50 g Boden (TG) zugesetzt wurden.

Die Applikation der aromatischen Säuren erfolgte in Anlehnung an Anderson und Domsch (1978). Dabei wurde die Substratmenge mit soviel Talkum vermischt, dass die anzuwendende Gesamtmenge (Substrat + Talkum) immer 300 mg betrug. Dieses Gemisch wurde mit Hilfe eines elektrisch betriebenen Handmixers in die Bodenproben eingerührt, so dass

eine homogene Substratverteilung gegeben war. Die Bebrütung der Bodenproben erfolgte bei 22 °C. Der CO_2-Ausstoß der Bodenproben wurde stündlich bis zum Erscheinen des Atmungsmaximums verfolgt. Die Daten dienen der Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit auf der Gemeinschaftsebene (Kap. 2.2.4).

2.2.3 Physiologische Untersuchungen an Reinkulturen

2.2.3.1 Tests auf Nutzung von aromatischen Säuren, Polymeren und hydrophoben Substanzen

Die in größeren Gruppen aus einem Bodenpaar isolierten Pilze sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die in der Tabelle 10 aufgeführten 21 aromatischen Säuren als einzige C- und Energiequelle nutzen zu können, getestet werden. Da 4-Methoxycinnamat in Medien von pH 6,0 immer ein Präzipitat bildete, wurde bei diesem Substrat auch die Hofbildung bonitiert. Jede aromatische Säure wurde in einer Konzentration von 10 mM in ein Minimalmedium (Tab. 9) eingearbeitet. Jede Substratplatte wurde mit vier Isolaten beimpft. Die Myzelstücke wurden vor dem Auslegen in einer sterilen Glukoselösung (25 mg l^{-1} Aqua dest.) gewaschen, um überschüssige Sporen abzuwaschen (Vermeidung von Sporenstreuungen) und eine Starthilfe für das Wachstum bereitzustellen. Als Kontrolle dienten Mineralsalzagarplatten (Tab. 9). Eine Substratnutzung war durch deutlich sichtbaren Bewuchs gekennzeichnet und musste eindeutig vom kryptischen Bewuchs der Kontrolle zu unterscheiden sein. Nach 14 Tagen Inkubation bei 25 °C wurden die Platten ausgewertet.

Die Überprüfung der Abbaubarkeit von 15 Polymeren und hydrophoben Substanzen (Tab. 11) wich wegen deren unterschiedlicher Verfügbarkeit und der davon abhängigen Zubereitung von dem oben beschriebenen Test auf Nutzung aromatischer Säuren ab. Zur Vorbereitung des Tests wurden zunächst Sporensuspensionen (1 ml) jedes Pilzes in Petrischalen mit einem Mineralsalzagar als Trägermedium (Fadenagar, pH 6,0) vermischt und bei 25 °C bebrütet. Der geringe Nährstoffgehalt des Fadenagars ließ die Auskeimung der Sporen und ein konfluentes, kryptisches Wachstum zu. Nach 24 h wurden auf die so herangezogenen Pilzkulturen etwa 0,5 cm × 0,5 cm große Substratstücke (sieben je Platte) ausgelegt. Diese waren vorher aus den Agarplatten ausgeschnitten worden, deren Herstellung in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben wurde. Als Kontrollstück wurde in jeder Plattenmitte ein Stück Mineralsalzagar (gereinigter Agar) ausgelegt. Lediglich mit dem Substrat Tannin wurde abweichend verfah-

ren. Für den Test mit diesem Substrat wurde ein Medium in herkömmlicher Weise bereitet (Tab. 9) und mit vier Myzelstücken je Agarplatte beimpft. Bei diesem Substrat wurde, wie bei 4-Methoxycinnamat, Wachstum und Aufklarung des Mediums bonitiert. Der Test wurde nach einer 14-tägigen Inkubation bei 25 °C ausgewertet. Die Daten dienen der Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit auf der Organismenebene (Kap. 2.2.4).

2.2.3.2 Untersuchungen zur Toleranz/Resistenz von Pilzen

2.2.3.2.1 Abschätzung von Wachstum und relativer Biomassebildung

Wie unter Kapitel 2.2.2.1.3 dargelegt, beruhte die Charakterisierung der Pilzisolate u.a. auf der Erfassung des linearen Wachstums durch Bildanalyse. Diese Messungen konnten auch bei Belastung der Testmedien mit Schwermetallen durchgeführt werden, so dass die Reduktion des Längenwachstums der Pilze infolge Schwermetallstress relativ einfach und genau bestimmt werden konnte. Bei diesen Messungen fiel auf, dass sich das Erscheinungsbild der Pilzkolonien auch in einer weiteren Hinsicht veränderte: sie wuchsen "dünner", d.h. ihr Myzel war weniger dicht ausgeprägt. Diese Erscheinung war bildanalytisch an der geringeren Extinktion im Durchlicht zu quantifizieren. Es wurde angenommen, dass aus der Multiplikation der Relativwerte von reduzierter Koloniefläche und reduzierter Koloniedichte ein Maß für die relative Biomassebildung unter verschieden starken Stressbedingungen abgeleitet werden konnte. Die entsprechenden Untersuchungen zur Entwicklung und Anwendung der Methode finden sich im Hauptteil dieser Arbeit (Kap. 3.1.2).

2.2.3.2.2 Nachweis von Protein und Sulfhydryl (SH)-Gruppen

Zur Quantifizierung von Protein und SH-Gruppen wurden ausgewählte kupfertolerante/-resistente und kupfersensitive Pilzisolate in 150 ml Flüssigmedium (Tab. 5) in Gegenwart von Kupfersulfat ($CuSO_4$) angezogen. Als Kulturgefäße dienten 1 Liter-Erlenmeyerkolben. Die in Vorversuchen als geeignet ermittelten Kontaminationsstufen waren neben der Kontrolle (0) 0,5, 1 und 1,5 mM Kupfer für tolerante/resistente sowie 0,33, 0,67 und 1 mM Kupfer für sensitive Pilze. Durch die Wahl geringerer Kupfergehalte für sensitive Pilze sollte gewährleistet sein, dass diese in allen Kontaminationsstufen genügend Biomasse bilden können.

Beimpft wurden die Kolben mit 1 ml einer dichten Sporensuspension in 0,004 % Prillösung (entsprechend 0,125 cm^2 einer ausgewachsenen Kolonie). Je nach Kontaminationsstufe und Ertrag wurden die Standkulturen nach drei bis sieben Tagen Inkubation im Dunkeln bei 25 °C abfiltriert, mit deionisiertem Wasser gewaschen und in 50 ml Bechergläsern bekannten Gewichts gewogen. Das Myzel wurde in der Regel drei Tage nach Versuchsansatz geerntet, da zu diesem Zeitpunkt schon ein ausreichender Zellertrag vorlag, die Kulturen aber noch nicht die stationäre Phase erreicht hatten (Kap. 3.3.4, Abb. 23). Sensitive Pilze, die bei 0,67 mM bzw. 1 mM Kupfer im Medium noch nicht genügend Biomasse gebildet hatten, mussten allerdings entsprechend länger kultiviert werden.

Anschließend erfolgte der Aufschluss des Myzels durch Mörsern unter Zugabe einer geeigneten Menge Aluminiumoxid (Al_2O_3). Die zugegebene Menge an Al_2O_3 orientierte sich am Ertrag der Biomasse. Damit das Zellmaterial möglichst fein gemörsert werden konnte, wurde das grob zerstoßene Myzel etwa 30 Min. im Gefrierfach angefroren. Die Zellpaste wurde in einen Zentrifugenbecher überspült (insgesamt 50 ml) und 10 Min. bei 13.000 Upm (18370 × g) und 10 °C zentrifugiert. 10 ml des Überstands wurden für die Protein- und SH-Gruppen-Bestimmung abgenommen. Der Rest sowie der nicht für die Messungen benötigte Teil des Überstands wurde in das zugehörige Becherglas überführt und bei 105 °C über Nacht bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Bestimmung des Biomasseertrags wurde die Einwaage an Al_2O_3 vom Trockengewicht abgezogen.

Anzucht und Aufschluss des untersuchten Zellmaterials erfolgten nach einer Methode von Baldrian (2000). Eine Abwandlung betraf lediglich den Zellaufschluss, der mit Al_2O_3 effektiver als mit dem ursprünglich verwendeten *Ultra Turrax* (TP 18/10, *Janke und Kunkel*, *IKA-Werk* Staufen, Deutschland) war. Die photometrische Bestimmung von Protein und SH-Gruppen erfolgte nach den Methoden von Bradford (1976) bzw. Ellman (1959). Das zur Quantifizierung von Proteinen benötigte *Bradford*-Reagenz (Bradford, 1976) wurde gemäß der Tabelle 15 hergestellt. Nach dem Mischen wurde das Reagenz durch einen Faltenfilter filtriert und bei 4 °C aufbewahrt. Es ist bis zu sechs Monate haltbar.

Tab. 15: *Bradford*-Reagenz.

▪ Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
▪ Ethanol (96 %)	50 ml
▪ Phosphorsäure (85 %)	100 ml
▪ Aqua bidest.	ad 1000 ml

Das zur Quantifizierung der SH-Gruppen benötigte *Ellman*-Reagenz (Ellman, 1959) und der darin enthaltene Phosphatpuffer wurden nach den Angaben der Tabellen 16 und 17 angesetzt. Nach dem Mischen wurde das Reagenz filtriert (Faltenfilter) und bei 4 °C aufbewahrt. Das Reagenz ist bis zu drei Monate haltbar.

Tab. 16: *Ellman*-Reagenz.

Bestandteil	Menge
▪ 5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) DTNB	3,96 mg
▪ Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0)	ad 100 ml

Tab. 17: Phosphatpuffer.

Bestandteil	Menge
▪ 0,1 M KH_2PO_4	50 ml
▪ 0,1 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	950 ml
▪ pH	8,0

Das Reaktionsgemisch zur Bestimmung des Proteingehalts von Pilzmyzelien enthielt 100 µl Probe und 1400 µl Reagenz. Beide wurden in einem *Eppendorf*-Reaktionsgefäß (1,5 ml) angesetzt und per Hand geschüttelt. Als Nullwert wurde anstelle der Probe 100 µl zweifach destilliertes Wasser verwendet. Der entstehende Farbkomplex war zwischen 5 Min. und 90 Min. stabil, seine Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Für Eichkurven (Kap. 3.3.4) diente Gamma-Globulin, das in Konzentrationsbereichen von 10-100 µg ml^{-1} bzw. 100-1000 µg ml^{-1} eingesetzt wurde. Die Proben wurden nach Bedarf vor der Messung mit Wasser verdünnt, wenn die Proteinkonzentration 1000 µg ml^{-1} überschritt. Die Messungen erfolgten in zwei Parallelen.

Das Reaktionsgemisch zur spektralphotometrischen Quantifizierung der SH-Gruppen wurde in einem *Eppendorf*-Reaktionsgefäß (1,5 ml) angesetzt und bestand aus 0-900 µl Probe, 300 µl *Ellman*-Reagenz sowie zweifach destilliertem Wasser bis zu einem Endvolumen von 1500 µl. Mischen erfolgte durch Schütteln von Hand. Als Nullwert wurde anstelle der Probe zweifach destilliertes Wasser verwendet. Nach 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen. Für die Erstellung der Eichkurve (Kap. 3.3.4) diente Glutathion in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 mM und 0,1221 mM (entsprechend 0-37,5 µg ml^{-1}). Die Sulfhydrylgruppen wurden als Schwefel (SH-S) gemessen. Es wurden jeweils mindestens zwei Parallelen gemessen.

2.2.4 Bestimmung ökologischer Indices

Artenreichtum und Diversität. Nach Odum (1980) gibt es mehrere Indices für die Vielfalt oder Diversität von Mikroorganismengemeinschaften bzw. Stichproben daraus. Hierzu werden drei Indices des Artenreichtums (3-5) gezählt. Dies sind:

$$d_1 = \frac{S-1}{\log N} \qquad (3)$$

$$d_2 = \frac{S}{\sqrt{N}} \qquad (4)$$

$$d_3 = \frac{S}{N} \qquad (5)$$

sowie der *Shannon-Index* der allgemeinen Diversität $\overline{H}$ (6) (Shannon und Weaver, 1969):

$$\overline{H} = -\sum \left(\frac{n_i}{N}\right) \times \log\left(\frac{n_i}{N}\right) \qquad (6),$$

wobei S = Zahl der Arten (Bildtypen)

N = Zahl der Individuen (Isolate) und

n_i = Zahl der Individuen je Art bzw. Bildtyp

$\frac{n_i}{N}$ = Bedeutungswert der Art.

In dieser Arbeit wurde der einfachste der drei Indices des Artenreichtums (d_3) verwendet, da sich diese Werte durch die sogenannte *rarefaction* (s.u.) auf gleiche Individuenzahlen beziehen lassen und anschließend leicht gemittelt werden können. Dies ist weder mit den beiden anderen Indices des Artenreichtums noch mit dem *Shannon-Index* möglich.

Rarefaction. Da Isolierungen meist zu unterschiedlichen Isolat- bzw. Individuenzahlen führen, ein Vergleich aber nur zwischen gleich großen Stichproben sinnvoll ist, müssen die Artenzahlen in den verschieden großen Stichproben auf dieselbe Individuenzahl bezogen werden. Dies wird durch die sogenannte *rarefaction* (Sanders, 1968; Simberloff, 1972) erreicht, die in der häufigen Zufallsauswahl gleich großer Unterstichproben aus den zu vergleichenden Stichproben und der Mittelung der jeweils zugehörigen Artenzahlen besteht. Dabei

wird die Größe der Unterstichprobe so gewählt, dass sie kleiner als die kleinste der zu vergleichenden Stichproben ist. Folglich werden große Stichproben etwas stärker ausgedünnt (*rarefied*) als kleine. Werden in dieser Zufallsrechnung (*Monte-Carlo*-Verfahren; Crowley, 1992) verschieden große Unterstichproben gezogen, so ergeben sich sogenannte *rarefaction*-Kurven, die die tatsächlichen Unterschiede zwischen zwei Stichproben wahrheitsgemäß widerspiegeln. Es ist klar, dass dieses Verfahren wegen der Mittelung Dezimalzahlen liefert. Für die Durchführung dieser Rechnungen standen laboreigene *DOS*-Programme zur Verfügung (Kap. 2.1.4). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zahl der Bildtypen auf die Unterstichprobengröße von 125 Isolaten (Individuen) bezogen. Ein Beispiel für die Unterscheidung zweier Stichproben mittels *rarefaction* zeigt die Abbildung 3.

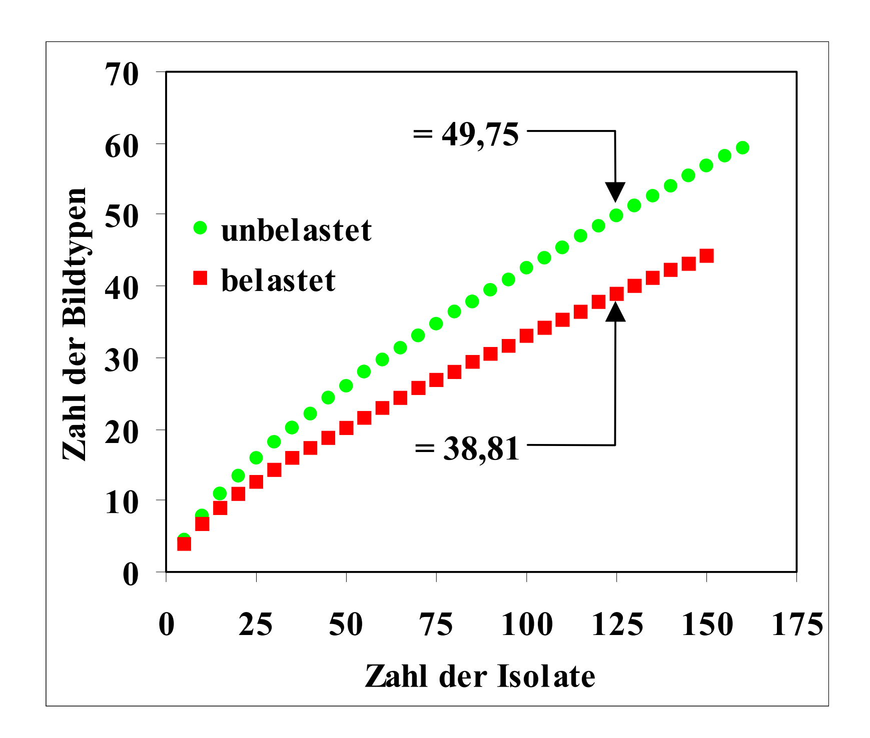


Abb. 3: Beispiel für den korrekten Vergleich des Artenreichtums von Stichproben durch *rarefaction*. In dieser Arbeit wurde die Zahl der Bildtypen zwecks Vergleich auf die Unterstichprobengröße von 125 Isolaten (Individuen) bezogen (Pfeile).

Variationskoeffizient des Wachstums. Die Abschätzung der Diversität mikrobieller Gemeinschaften beruht auf der Unterscheidung von Arten oder anderen Einheiten, deren Bestimmung ihrerseits von der Messung mehrerer charakteristischer Merkmale abhängt. Unterschiede zwischen Gemeinschaften können aber auch aufgezeigt werden, wenn nur ein einzi-

ges Merkmal erfasst wird. Ein geeignetes Merkmal ist z.B. die Wachstumsrate, wenn sie unter absolut gleichbleibenden Bedingungen gemessen wird. Da die Erfassung nur eines Merkmals eine Gruppierung von Organismen nicht erlaubt, ist damit die Bestimmung eines Diversitätsindex nicht möglich. Man kann aber davon ausgehen, dass jede Pilzart durch eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit gekennzeichnet ist. Unterschiede innerhalb einer Gemeinschaft hinsichtlich dieses Merkmals würden dann nicht nur die Variabilität der Arten bezüglich dieses Merkmals widerspiegeln, sondern könnten auch als ein Indikator für die Diversität der Gemeinschaft angesehen werden. Durch Bestimmung der Durchschnittswerte der Wachstumsraten und ihrer Streuung sowie den daraus abgeleiteten Variationskoeffizienten lassen sich die untersuchten Gemeinschaften charakterisieren. In dieser Arbeit wurde der Variationskoeffizient aus dem Durchschnittswert der Wachstumsraten und der mittleren Abweichung berechnet (7). Die mittlere Abweichung wurde gewählt, um klarzumachen, dass es sich nicht um Mehrfachmessungen an einem Organismus, sondern um einmalige Messungen an einer größeren Zahl unterschiedlicher Organismen handelt:

$$\text{Variationskoeffizient} = \frac{\text{MA}}{\text{DW}} \qquad (7),$$

wobei MA = mittlere Abweichung vom Durchschnittswert

$$= \frac{\sum \sqrt{(\text{DW} - \text{W}_{1-n})^2}}{n}$$

n = Anzahl der untersuchten Isolate

DW = Durchschnittswert aller Wachstumsraten

W_{1-n} = jeder einzelne von n Messwerten.

Indices der Verteilung von Fähigkeiten in Pilzgemeinschaften. Während bei der Abschätzung des Artenreichtums bzw. der allgemeinen Diversität (*Shannon-Index*) einer Gemeinschaft potentiell alle Arten dieser Gemeinschaft in der Stichprobe erscheinen können, kann von den tatsächlich vorhandenen Fähigkeiten der Gemeinschaft nur ein Bruchteil nachgewiesen werden, weil nicht alle möglichen Tests durchgeführt werden können. Wegen dieser Einschränkungen ist es wenig sinnvoll, die Vielfalt der Leistungen einer Gemeinschaft, wie gelegentlich beobachtet (Degens, 1998; Degens und Harris, 1997; Degens et al., 2000; 2001), als Diversität anzugeben. Viel sinnvoller erscheint in diesem Zusammenhang, nur die Vertei-

lung der tatsächlich gemessenen Fähigkeiten anzugeben. Ein Maß für die Verteilung von Fähigkeiten ist z.B. die sogenannte *evenness* (8) (Pielou, 1966), die allerdings vom *Shannon-Index* der allgemeinen Diversität abgeleitet ist:

$$e = \frac{\overline{\mathrm{H}}}{\log \mathrm{A}} \qquad (8),$$

wobei $\overline{\mathrm{H}}$ = *Shannon-Index*

A = Zahl der angebotenen Substrate.

Dabei muss in der o.a. Gleichung (6) als Bedeutungswert für jede substratspezifische Fähigkeit der Term

$\frac{f_i}{F}$ eingesetzt werden,

wobei f_i = Zahl substratspezifischer *CFU* oder reziproker Abbauzeiten

F = Summe aller *CFU* oder reziproker Abbauzeiten.

Da $\overline{\mathrm{H}}$ immer etwas kleiner als der Logarithmus der Artenzahl (bzw. hier: die Zahl der durchgeführten Tests) ist, ist aus Gleichung (8) abzuleiten, dass die *evenness* den Wert 1 nicht überschreiten kann. Um die Berechnung der *evenness* ermöglichen zu können, war es allerdings notwendig, anstelle Null (bei Nichtnutzung eines Substrats) einen sehr kleinen Wert (z.B. 1×10^{-10}) einzusetzen.

Als Maß für die Verteilung von Abbaufähigkeiten in Gemeinschaften haben Wenderoth und Reber (1999 b) einen Index eingeführt, den sie als "katabolische Vielseitigkeit" (9) bezeichneten:

$$\text{Katabolische Vielseitigkeit} = \frac{\mathrm{DW}}{\mathrm{MA}} \qquad (9),$$

wobei DW = Durchschnittswert aller substratspezifischen Messwerte (z.B. *CFU* bzw. reziproker Abbauzeiten)

MA = mittlere Abweichung vom Durchschnittswert (s.o.).

Die Entwicklung dieses Index, der dem Kehrwert des Variationskoeffizienten enspricht, beruht auf der Beobachtung, dass in schwermetallgestressten Bakteriengemeinschaften der Anteil der Isolate mit relativ hoher Zahl (getesteter) katabolischer Fähigkeiten abnahm, umgekehrt der Anteil der Isolate mit geringer Zahl von Fähigkeiten zunahm (Abnahme der katabolischen Vielseitigkeit auf der Organismenebene). Entsprechend nahm mit steigender Bodenbelastung der Anteil der an sich schon häufigen substratspezifischen *CFU* zu, der der seltenen dagegen weiter ab, d.h., die Variation der Messwerte erhöhte sich. Dieser Zusammenhang wurde zur Berechnung des Index der katabolischen Vielseitigkeit auf der Gemeinschaftsebene herangezogen. Da der Durchschnittswert nur von der Zahl der Tests abhängt, also innerhalb eines Versuchs einen konstanten Wert aufweist, nimmt die katabolische Vielseitigkeit bei Stress ab.

Varianzanalysen (*ANOVA*: *analysis of variance*) erfolgten mit Hilfe des Programms *WinSTAT* (*R. Fitch Software*, Staufen, Deutschland) unter Anwendung der Methode *LSD* (*least significant difference*) bei Einstellung einer Signifikanz von p = 0,05. Signifikante Unterschiede wurden entweder durch Konfidenzintervalle oder unterschiedliche Buchstabenindices ($_{a,\ b,\ c}$) gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung von Methoden

3.1.1 Entwicklung und Erprobung eines kombinierten Verfahrens aus Bild- und Clusteranalyse zur Bestimmung der strukturellen Diversität von Stichproben aus Pilzgemeinschaften

Die klassische Methode, bei der eine große Zahl von Isolaten möglichst gleichen Koloniealters zeitgleich angeimpft werden müssen, damit eine Sortierung nach Kolonieaspekt, Form von Sporen und Sporenträgern mit geringer Fehlerquote erfolgen kann, ist relativ arbeitsaufwändig. Bei Eingruppierung einer großen Zahl von Isolaten sind daher andere Untersuchungen, wie z.B. die Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit der Pilze, oft nicht realisierbar. Es wurde vermutet, dass die Bildanalyse eine Möglichkeit darstellt, beiden Ansprüchen gerecht zu werden. Wegen der Speicherbarkeit zeitlich versetzt aufgenommener Bilder wäre es auch möglich, die eigentliche Bildanalyse (Erstellen der Bilddaten) zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen und, wenn nötig, das Ergebnis der sich anschließenden Clusteranalyse (s.u.) anhand der Bilder subjektiv zu überprüfen. Außerdem würde es die Methode gestatten, annähernd identische Pilzisolate, z.B. aus zwei miteinander zu vergleichenden Gemeinschaften, für anschließende physiologische Untersuchungen leicht zu identifizieren. Die Bildanalyse kann nicht, wie das Gehirn, sämtliche im Bild enthaltene Information nutzen. Vielmehr besteht ihre Arbeitsweise darin, die vorhandene Information mit Hilfe parametrisierter Messfunktionen in eine relativ kleine Zahl von Bilddaten umzuwandeln. Solche Messfunktionen ermöglichen z.B. die Wiedergabe von Farbwerten und die Bestimmung der Objektgröße. Damit die so gewonnenen Bilddaten zur Gruppierung von Pilzisolaten herangezogen werden können, müssen sie noch einer sogenannten Clusteranalyse (Kap. 2.2.2.1.4) unterworfen werden, die einer Ähnlichkeitsanalyse gleichkommt. In den Abbildungen 4-7 sind als Beispiel vier vom Bildanalysesystem aufgenommene Pilze unterschiedlicher Gattungen von der Ober- und Unterseite der Pilzkolonien dargestellt. Die zugehörigen Bildanalysedaten zeigt die Tabelle 18.

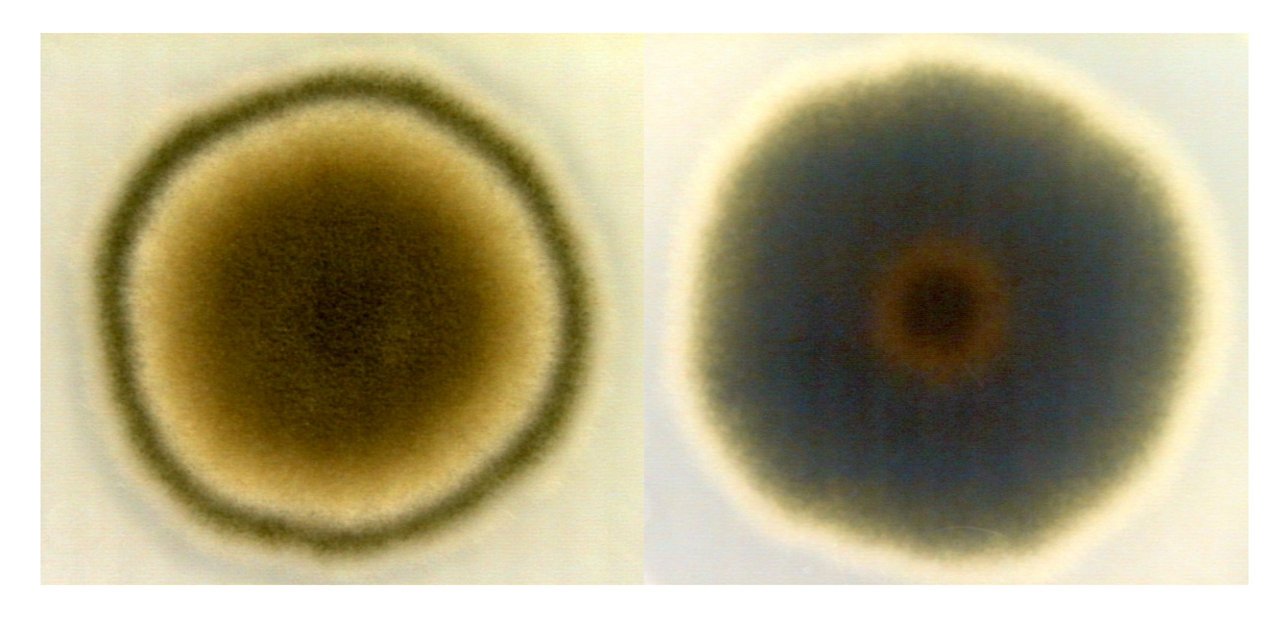


Abb. 4: Pilzkolonie von *Alternaria* sp., Oberseite (links) und Unterseite (rechts).

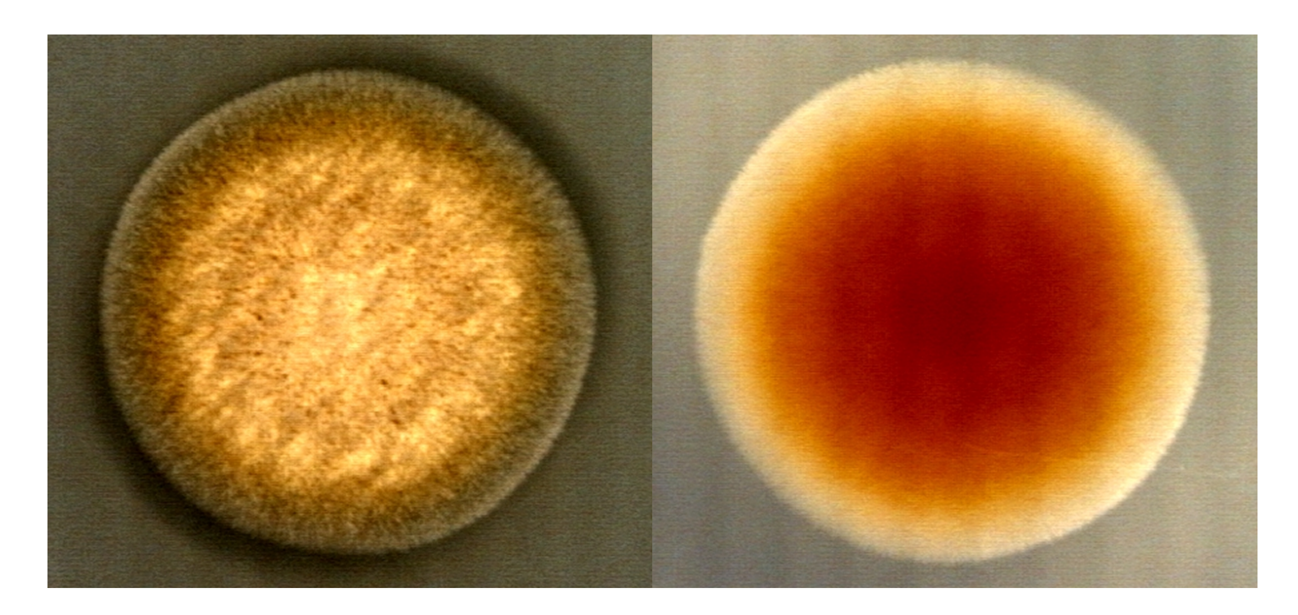


Abb. 5: Pilzkolonie von *Gliocladium* sp., Oberseite (links) und Unterseite (rechts).

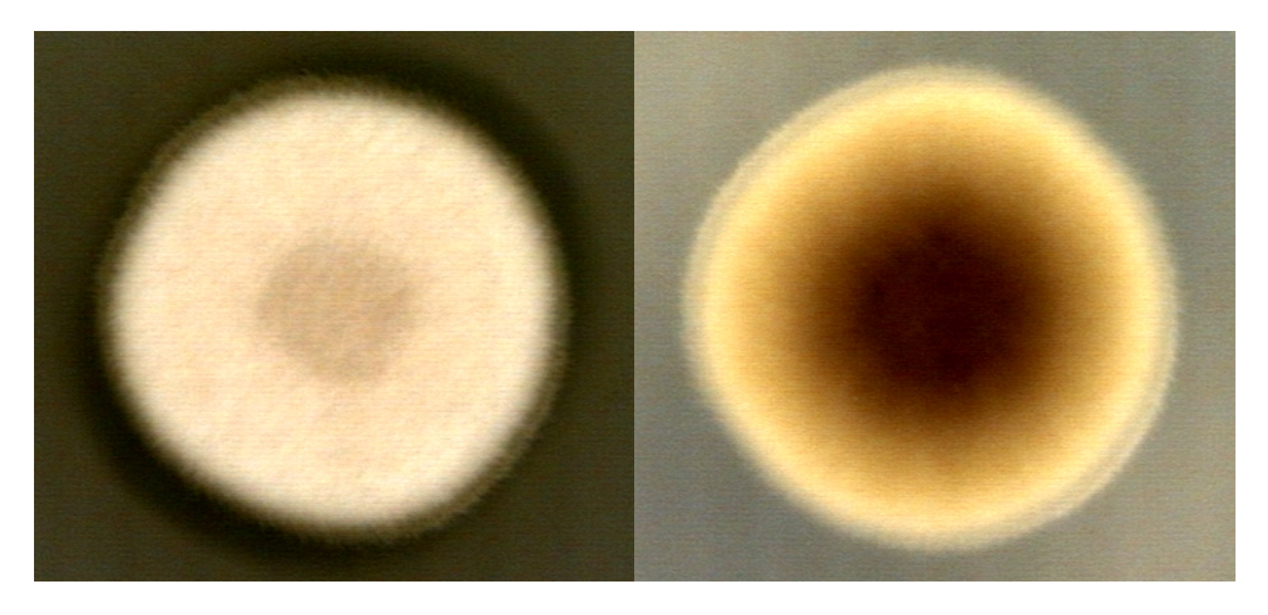


Abb. 6: Pilzkolonie von *Paecilomyces lilacinus*, Oberseite (links) und Unterseite (rechts).

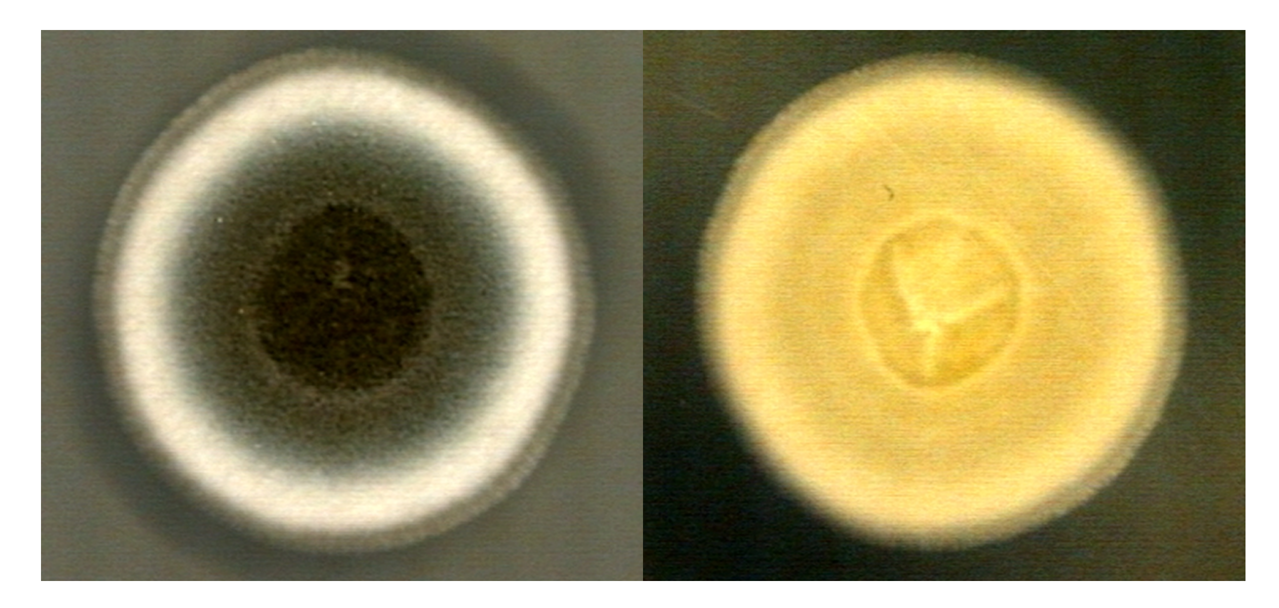


Abb. 7: Pilzkolonie von *Penicillium fellutanum*, Oberseite (links) und Unterseite (rechts).

Tab. 18: Bildanalysedaten von vier Pilzstämmen unterschiedlicher Gattung. Jeder Pilz wurde in den 20 in dieser Arbeit eingesetzten Messparametern (MP1-MP20*, Kap. 2.2.2.1.3) vermessen.

	Pilzstamm			
Mess-parameter*	*Alternaria* sp.	*Gliocladium* sp.	*Paecilomyces lilacinus*	*Penicillium fellutanum*
MP1	3,9541	2,7068	1,9988	1,6127
MP2	69	104	158	124
MP3	93	153	179	135
MP4	80	112	162	130
MP5	35	50	135	107
MP6	137	144	144	134
MP7	152	131	37	38
MP8	10,2473	7,5527	5,7892	7,0748
MP9	10,0290	7,5528	5,7915	7,0479
MP10	57	87	98	139
MP11	65	152	134	168
MP12	62	86	104	150
MP13	43	25	56	99
MP14	135	143	141	137
MP15	72	199	115	72
MP16	48,3478	21,8702	29,1565	9,5986
MP17	11,8518	8,7208	8,2710	6,0474
MP18	3,5615	1,3032	1,8749	0,4428
MP19	11,4654	8,6325	8,2021	6,0620
MP20	3,2977	1,2121	1,7390	0,4424

*Lineares Wachstum in mm d^{-1} (MP1).
Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (MP2), *Mean Red* (MP3), *Mean Green* (MP4), *Mean Blue* (MP5), *Hue Typical* (MP6), *Mean Saturation* (MP7), *Mean Brightness* (MP8), *Mean Density* (MP9).
Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (MP10), *Mean Red* (MP11), *Mean Green* (MP12), *Mean Blue* (MP13), *Hue Typical* (MP14), *Mean Saturation* (MP15), *Gray Variation* (MP16), *Mean Brightness* (MP17), *Bright Variation* (MP18), *Mean Density* (MP19), *Density Variation* (MP20).

3.1.1.1 Suche nach geeigneten Bedingungen für die Bildaufnahme

Wenn Größe, Struktur und Farbe eines Pilzes sowohl für die Gewinnung von Bilddaten als auch für die vorgesehene subjektive Überprüfung von Pilzgruppen (Cluster) aufgrund von Bildern möglichst optimal aufgenommen werden sollen, müssten Pilzkolonien nicht nur bildfüllend, sondern auch farblich so dargestellt werden, dass sowohl das Bildanalysesystem als auch das menschliche Sehvermögen Unterschiede optimal erkennen können. Diese Forderungen waren mit einer einzigen Aufnahme nicht zu erfüllen, so dass ein Kompromiss hinsichtlich Kameraabstand und Lichtintensität gefunden werden musste. In diesem Zusammenhang muss gesagt werden, dass die verwendete Kamera die Belichtung nicht wie ein Fotoap-

parat an die herrschende Beleuchtungsintensität anpassen kann, sondern dass Blende und Belichtungszeit manuell eingestellt und konstant gehalten werden müssen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit von Aufnahmebedingungen und folglich auch von Bildern ist dies auch nötig. Natürlich wäre eine Anpassung des Kameraabstands an die Größe der Pilzkolonie mit Einschränkungen möglich. Bei der Vermessung eines hellen (beigefarbenen) Pilzes in den vier Grundfarben Grau, Rot, Grün und Blau fiel aber auf, dass die Bilder mit abnehmenden Kameraabständen (68 > 36 > 17 cm) dunkler wurden (erkennbar an abnehmenden Messwerten) und gleichzeitig Rot gegenüber den anderen Farben relativ zunahm. Diese Beobachtung war Anlass, den Einfluss des Kameraabstands auf vier Farbparameter (Kap. 2.2.2.1.3) anhand von Farbtesttafeln zu untersuchen (Tab. 19). Die abnehmenden Messwerte bestätigen, dass die Farben mit geringerem Kameraabstand dunkler werden und Farbverhältnisse sich geringfügig verändern. Für die Aufnahme von Pilzbildern würde dies bedeuten, dass bei unterschiedlichen Kameraabständen trotz konstanter Belichtung große (schnellwüchsige) Isolate relativ heller dargestellt würden als kleine (langsamwüchsige) und dass Isolate einer Art und einer kritischen Größe, bei der ein vorher festgelegter Wechsel von einem Kameraabstand zum anderen erfolgen müsste, durch voneinander abweichende Bilddaten charakterisiert würden. Besonders gravierend würde sich dieser Sachverhalt auf die Bilder großer und heller bzw. kleiner und dunkler Pilzkolonien auswirken, die bei großem Kameraabstand überbelichtet, bei kleinem Abstand dagegen unterbelichtet wären. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich auch, dass für eine nachträgliche subjektive Überprüfung von Pilzgruppen nur ein mittlerer Kameraabstand in Frage kommt, bei dem die Gefahr einer Über- bzw. Unterbelichtung wahrscheinlich wesentlich eingeschränkt ist. Daher war experimentell zu untersuchen, ob und welche Nachteile sich eventuell aus der Verwendung nur eines mittleren Kameraabstands ergeben und zu entscheiden, ob diese akzeptiert werden können.

Ein Problem stellte zunächst die Abbildbarkeit der Kolonien dar. Da mit dem Kameraabstand von 68 cm der gesamte Durchmesser der Petrischalen abgebildet werden konnte, galt dies auch für die zum Zeitpunkt der Bildaufnahme (7 d nach Animpfen) ausgewachsenen Pilze. Bei Aufnahme mit dem mittleren Kameraabstand von 36 cm war aber nur ein Koloniedurchmesser von bis zu 48 mm vollständig abbildbar. Da in dieser Arbeit die Wachstumsraten aller Pilze bestimmt wurden (Abb. 8), ließ sich der Anteil der Pilze abschätzen, die nach der festgesetzten Bebrütungsdauer von sieben Tagen den kritischen Koloniedurchmesser von 48 mm überschritten hatten. Dies waren Pilze einer täglichen Wachstumsrate > 6,86 mm. Aus den Daten der Abbildung 8 ließ sich entnehmen, dass nur 70 von 1629 betrachteten Pilzisola-

Tab. 19: Auswirkungen des Kameraabstands auf vier Farbparameter (Kap. 2.2.2.1.3) bei Vermessung verschiedener Farbtesttafeln. Mit geringerem Kameraabstand nehmen die Farbmesswerte ab.

Farbtesttafel	Kameraabstand [cm]*	*Mean Gray*	*Mean Red*	*Mean Green*	*Mean Blue*
rot	68	53	157	4	0
	36	49	148	0	0
	17	40	122	0	0
grün	68	94	90	128	65
	36	87	85	120	58
	17	65	63	92	41
blau	68	112	39	96	202
	36	102	32	89	187
	17	78	18	70	148
weiß	68	255	255	255	255
	36	138	149	144	124
	17	105	113	110	93

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.

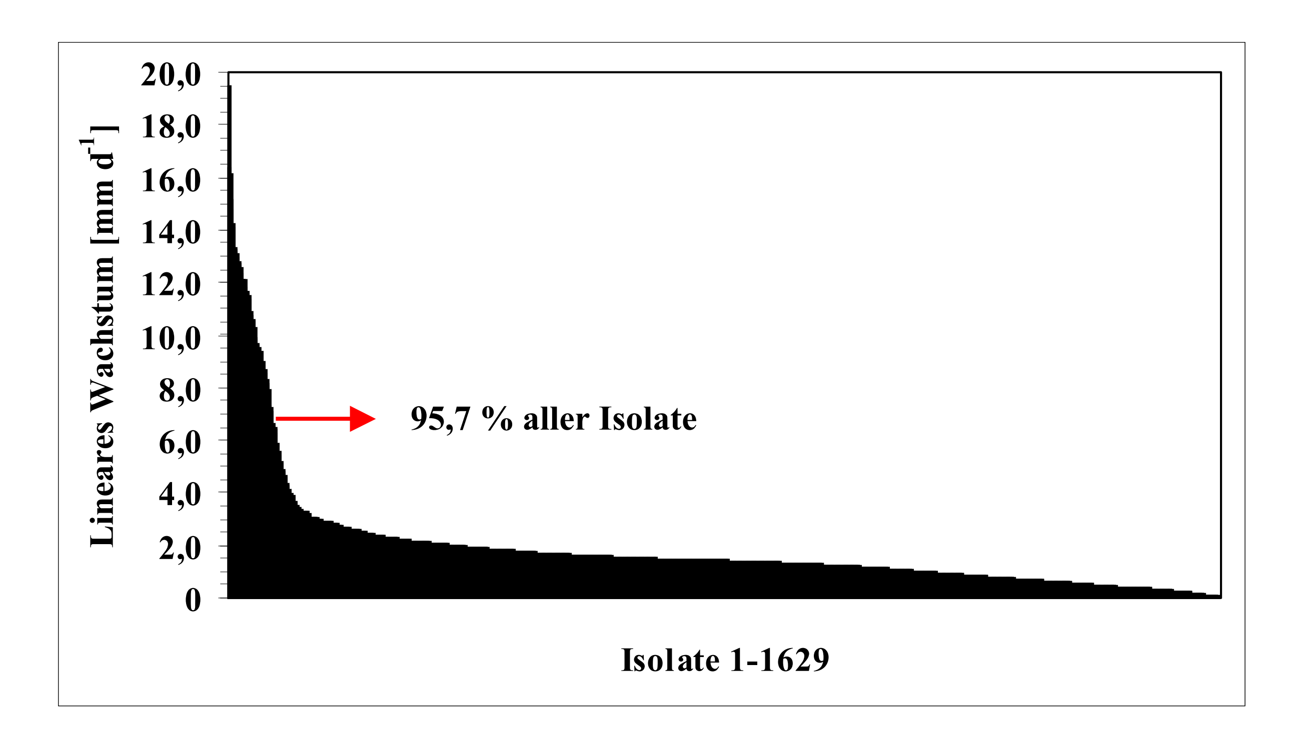


Abb. 8: Verteilung der Wachstumsraten von 1629 Pilzisolaten. Isolate mit einer täglichen Wachstumsrate von bis zu 6,86 mm sind mit einem Kameraabstand von 36 cm vollständig abbildbar. Dies entspricht 95,7 % der untersuchten Isolate.

ten (4,3 %) zum festgesetzten Termin der Bildaufnahme einen Koloniedurchmesser > 48 mm aufwiesen und nicht vollständig aufgenommen werden konnten. Zu diesen Pilzen gehörten vor allem Isolate der Gattungen *Mucor* und *Trichoderma*, die für die etwaige visuelle Über-

prüfung der Gruppenzugehörigkeit zusätzlich bei einem Abstand von 68 cm aufgenommen wurden. Dieser zusätzliche Aufwand erschien akzeptabel. Der kleine Kameraabstand (17 cm) konnte dagegen nur Kolonien von maximal 21 mm Durchmesser abbilden. Dies entsprach einer täglichen Wachstumsrate von 3 mm und einem Anteil von 8,8 % nicht vollständig abbildbarer Pilze.

Genauso wichtig wie der Anteil der nicht voll aufgenommenen Bilder ist die Frage, ob der für die visuelle Beurteilung von Pilzbildern als besonders geeignet angesehene Kameraabstand von 36 cm auch für die computergestützte Gruppierung der Pilze ausreichend gute Bilddaten liefert. Um diese Frage beantworten zu können, wurden 20 sich in ihrem Grauwert unterscheidende Pilze bei den drei Kameraabständen von 68, 36 und 17 cm (von Frontlinse bis Agaroberfläche) hinsichtlich der 19 in die Untersuchungen einbezogenen Farbparameter vermessen (Bildanalysedaten der 20 Pilze, jeweils für die drei Kameraabstände, im Anhang unter 7.1). Da die modernen Verfahren der Hauptkomponentenanalyse bzw. der Clusteranalyse auf der Berechnung von Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern beruhen wurde angenommen, dass die obige Frage durch Bestimmung aller möglichen Korrelationskoeffizienten zwischen den betrachteten Farbparametern und ihrer Verrechnung beantwortet werden kann. Durch Hauptkomponentenanalyse war es möglich, für jeden der drei Datensätze die Summe aller 171 Korrelationskoeffizienten aus der ausgegebenen Korrelationsmatrix zu bestimmen (Tab. 20, Spalte 2). Da eine hohe Korrelation zwischen zwei Messreihen, ähnlich wie die starke Kopplung binärer Datenreihen, ein Zeichen für relativ geringe Unterscheidungskraft zweier Parameter ist, je nachdem, wie stark beide mit den verbleibenden Parametern korreliert sind, muss derjenigen Datenreihe die höchste Unterscheidungskraft zugeordnet werden, bei der die Summe der Korrelationskoeffizienten am geringsten ist. Um die Unterscheidungskraft der mit verschiedenen Kameraabständen gewonnenen Daten quantifizieren zu können, mussten die in Spalte 2 aufgeführten Werte noch von der maximal möglichen Summe aller Korrelationskoeffizienten subtrahiert werden (Spalte 3). Diese Summe beträgt 171, wenn alle möglichen Korrelationen zwischen den 19 betrachteten Farbparametern den Wert 1 aufweisen (s. Reihengleichung 10):

$$s_n = a_1 + a_2 + \ldots + a_n = \sum_{i=1}^{n} a_i \qquad (10),$$

wobei $n = 18$.

Die relative Vorzüglichkeit der Bilddaten aus den drei Kameraabständen ergab sich durch Relativierung (Spalte 4). Es zeigte sich, dass, entgegen der Annahme, der kleinste Kameraabstand Daten mit der höchstmöglichen Unterscheidungskraft lieferte, die Daten der beiden anderen Kameraabstände aber hinsichtlich ihrer Auswertbarkeit nur um etwa 5-6 % schlechter zu beurteilen waren.

Tab. 20: Berechnung der Unterscheidungskraft von drei Kameraabständen aus den 171 möglichen Korrelationen von 19 farbparameterspezifischen Bilddaten. Berechnungsgrundlage bildeten 20 sich in ihrem Grauwert unterscheidende Pilze, die in den 19 in dieser Arbeit eingesetzten Farbparametern (Kap. 2.2.2.1.3) bei allen drei Kameraabständen vermessen wurden (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.1).

Kameraabstand [cm]*	Σ_{Kor}**	Σ_{Kor_max}-Σ_{Kor} (Unkorreliertheit)	Rel. Vorzüglichkeit der Bilddaten [%]
68	89,36	81,64	94,16
36	88,84	82,16	94,76
17	84,30	86,70	100

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.
**Summe aller 171 Korrelationskoeffizienten aus der Korrelationsmatrix (Hauptkomponentenanalyse).

Eine Bewertung aller in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen ergibt sich aus der Tabelle 21. Schon wegen der oben festgestellten Unvereinbarkeit von Bildern bzw. Bilddaten aus verschiedenen Kameraabständen bei der computergestützten Gruppierung und der besseren subjektiven Überprüfbarkeit von Datengruppen (Clustern) durch Bilder, war die Verwendung des mittleren Abstands geboten. Die Tabelle 21 macht deutlich, dass dieser Abstand hinsichtlich zweier Kriterien den mittleren Rang einnahm, während der bezüglich der Bilddaten als optimal zu beurteilende kleine Abstand hinsichtlich des Anteils unvollständig erfasster großer Kolonien am schlechtesten abschnitt. Es zeigt sich somit, dass der mittlere Abstand zwar nicht in jeder Hinsicht optimal ist, durch die geringen Abweichungen vom jeweiligen Optimum aber einen guten Kompromiss darstellt.

Wie am Anfang dieses Abschnitts gesagt wurde, sollte es möglich sein, die durch computergestützte Clusterung gebildeten Gruppen visuell zu begutachten. Es wurde vermutet, dass für diesen Zweck die für die Bildanalyse wichtigen Parameter der Verteilung von Farben und Helligkeit eine untergeordnete Rolle spielen, die eigentlichen Farbparameter Grau, Rot, Grün und Blau dagegen, entsprechend den vier Arten von Sinneszellen des menschlichen Auges, von größerer Bedeutung seien. Da das Auge Farben nur in einem bestimmten Intensitäts-

bereich des Lichts sehen kann (unterhalb einer gewissen Intensität werden alle Farben als Schwarz, oberhalb als Weiß wahrgenommen), sind Intensitätsunterschiede für das Sehen von Bedeutung. Deshalb erschien es sinnvoll, die Variationskoeffizienten von Grau, Rot, Grün, und Blau mit den bildanalytisch ebenfalls wichtigen Parametern der Farbverteilung zu vergleichen bzw. zu verrechnen.

Tab. 21: Beurteilung der drei betrachteten Kameraabstände hinsichtlich ihrer Eignung für die Gewinnung von Bilddaten und deren subjektive Beurteilung durch Bilder.

Kamera-abstand [cm]*	Unvollständig abgebildete Kolonien [%]	Rel. Vorzüglichkeit der Bilddaten [%]	Subjektive Beurteilung
68	0	94,16	nicht optimal
36	4,3	94,76	optimal
17	8,8	100	nicht optimal

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.

Wie die Tabelle 22 zeigt, nimmt der Durchschnittswert aller 19 Variationskoeffizienten in der Reihenfolge der Kameraabstände 68 > 36 > 17 cm ab, während der Durchschnittswert aller elf Parameter für die Verteilung von Farben und Helligkeit in der Reihenfolge der Kameraabstände 68 > 17 > 36 cm zurückgeht. Nur der Durchschnittswert der Variationskoeffizienten der acht eigentlichen Farbparameter ist beim mittleren Kameraabstand am höchsten, gefolgt von den Kameraabständen 68 cm und 17 cm. Damit bestätigt sich die Vermutung, dass für eine etwaige visuelle Überprüfung von Datenclustern der mittlere Kameraabstand der am besten geeignete ist.

Das Clusterergebnis der Bildanalysedaten der 20 sich in ihrem Grauwert unterscheidenden Pilze zeigen die Dendrogramme in den Abbildungen 9-11. Es ist zu erkennen, dass sich die drei Dendrogramme hinsichtlich Zusammensetzung der Cluster, Reihenfolge bzw. Anordnung der Isolate und Distanz nur geringfügig voneinander unterscheiden. Beispielsweise ist die Distanz im Dendrogramm der mit einem Kameraabstand von 17 cm vermessenen Pilze etwas geringer als bei den beiden anderen Dendrogrammen. Zwischen den mit einem Kameraabstand von 68 cm und 36 cm erstellten Dendrogrammen ist auch die Ähnlichkeit bezüglich der Anordnung der Isolate größer, da das Isolat P16 nur in dem mit einem Kamera-

Tab. 22: Durchschnittswerte farbparameterspezifischer Variationskoeffizienten bei drei Kameraabständen. Berechnungsgrundlage bildeten 20 sich in ihrem Grauwert unterscheidende Pilze, die in den 19 in dieser Arbeit eingesetzten Farbparametern (Kap. 2.2.2.1.3) bei allen drei Kameraabständen vermessen wurden (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.1). Der Durchschnittswert der für eine visuelle Überprüfung von Datenclustern wichtigen eigentlichen Farbparameter ist beim mittleren Kameraabstand am größten.

Kamera-abstand [cm]*	DW aller 19 VK**	DW der VK der Parameter F1-F4 u. F9-F12+	DW der VK der Parameter F5-F8 u. F13-F19++
68	0,495 ± 0,323	0,225 ± 0,070	0,691 ± 0,289
36	0,382 ± 0,314	0,277 ± 0,093	0,458 ± 0,396
17	0,351 ± 0,392	0,196 ± 0,065	0,464 ± 0,490

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.
**VK = Variationskoeffizient (SD/DW), wobei SD = Standardabweichung, DW = Durchschnittswert.
+Eigentliche Farbparameter: Kolonieoberseite: *Mean Gray* (F1), *Mean Red* (F2), *Mean Green* (F3), *Mean Blue* (F4); Kolonieunterseite: *Mean Gray* (F9), *Mean Red* (F10), *Mean Green* (F11), *Mean Blue* (F12).
++Parameter für Verteilung von Farben u. Helligkeit: Kolonieoberseite: *Hue Typical* (F5), *Mean Saturation* (F6), *Mean Brightness* (F7), *Mean Density* (F8); Kolonieunterseite: *Hue Typical* (F13), *Mean Saturation* (F14), *Gray Variation* (F15), *Mean Brightness* (F16), *Bright Variation* (F17), *Mean Density* (F18), *Density Variation* (F19).

abstand von 17 cm erstellten Dendrogramm bereits am ersten Knotenpunkt (von der höchsten Distanz aus betrachtet) von den übrigen Isolaten abgetrennt wird. Das Cluster mit den Isolaten P6-P10 ist dagegen in allen drei Dendrogrammen vorhanden.

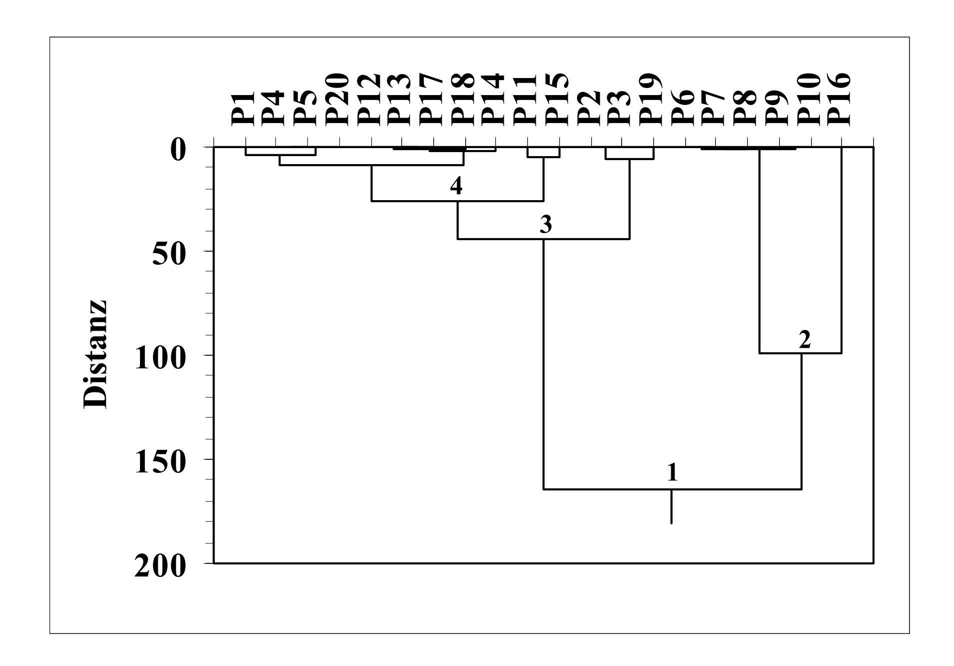


Abb. 9: Dendrogramm von 20 Testpilzen (P1-P20), die in 19 Farbparametern (Kap. 2.2.2.1.3) mit einem Kameraabstand von 68 cm vermessen wurden (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.1). Die ersten vier Knotenpunkte (von der höchsten Distanz aus betrachtet) sind nummeriert.

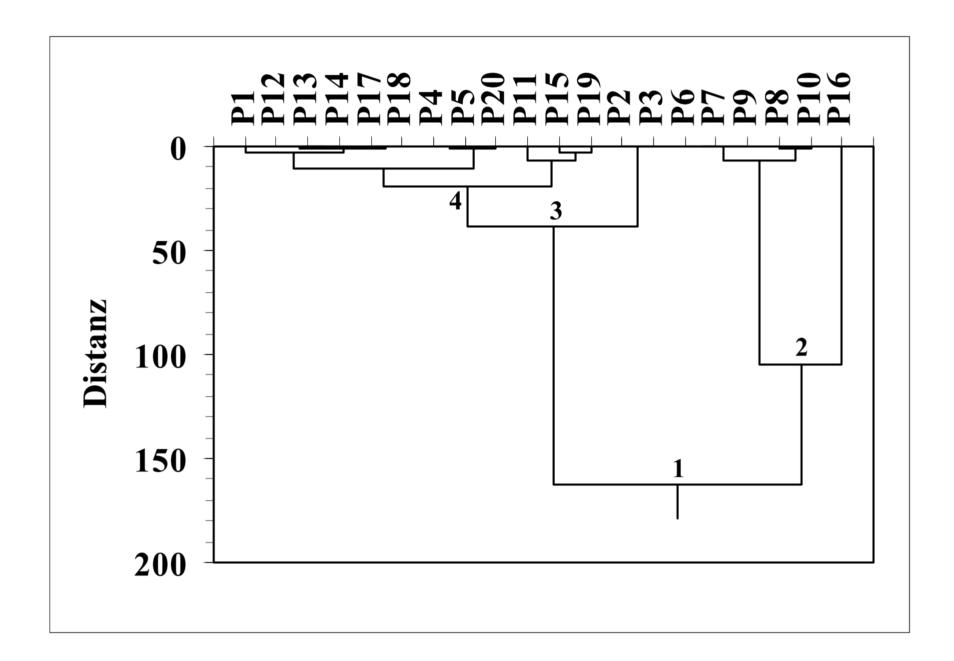


Abb. 10: Dendrogramm von 20 Testpilzen (P1-P20), die in 19 Farbparametern (Kap. 2.2.2.1.3) mit einem Kameraabstand von 36 cm vermessen wurden (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.1). Die ersten vier Knotenpunkte (von der höchsten Distanz aus betrachtet) sind nummeriert.

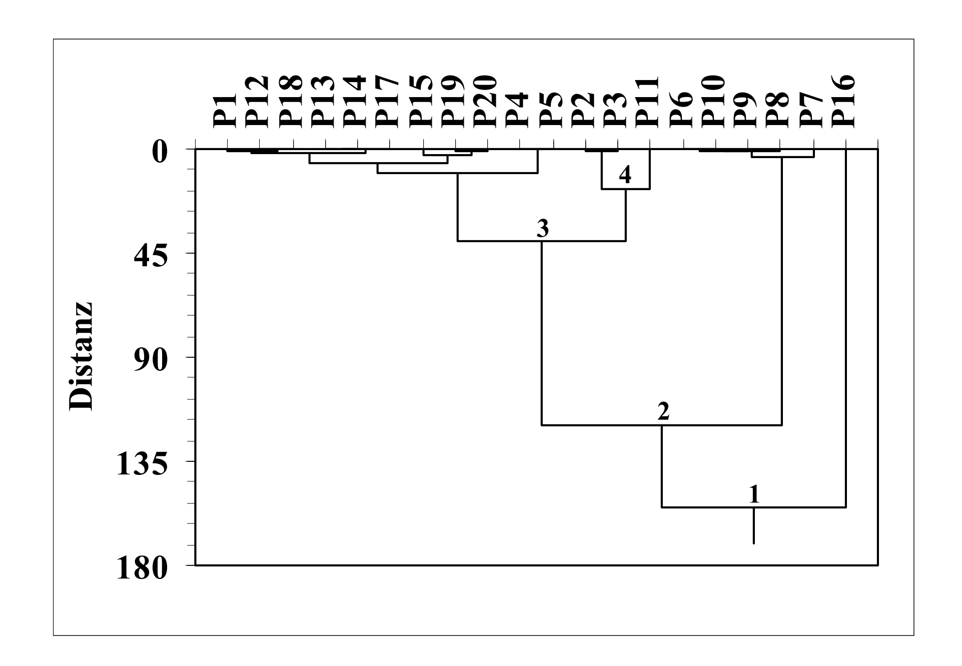
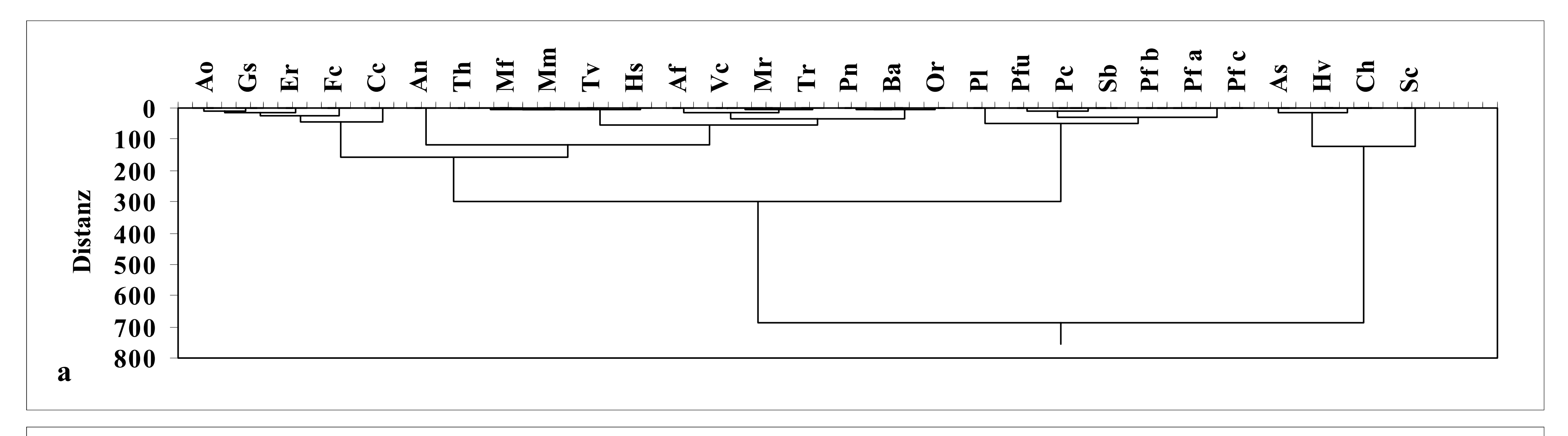


Abb. 11: Dendrogramm von 20 Testpilzen (P1-P20), die in 19 Farbparametern (Kap. 2.2.2.1.3) mit einem Kameraabstand von 17 cm vermessen wurden (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.1). Die ersten vier Knotenpunkte (von der höchsten Distanz aus betrachtet) sind nummeriert.

3.1.1.2 Differenzierungskraft der 20 Messparameter beim Kameraabstand von 36 cm

Die Unterscheidungskraft aller von einem Bildanalysesystem verwendeten Parameter kann auf einfache Weise durch Clusteranalyse der Bilddaten von Vergleichsstämmen bekannter Pilze ermittelt werden. Wenn diese Pilze in Parallelkulturen vorliegen könnte man erwarten, dass in dem zu erstellenden Dendrogramm die Parallelen eines Stamms nebeneinander angeordnet, d.h. von den Parallelen anderer Stämme getrennt sind. Dies würde eventuell auch gelten, wenn von einer Art unterschiedliche Stämme vorlägen. Wären Isolate einer Art dagegen identische Stämme, so würden sich die Bezeichnungen der Parallelkulturen wahrscheinlich durchmischen, d.h. sie wären nicht mehr unbedingt als Parallelen nebeneinander angeordnet. Die Abbildung 12 zeigt das Dendrogramm der Bilddaten der 29 in der Tabelle 12 aufgeführten verschiedenfarbigen Vergleichsstämme von Pilzarten sowie einen Ausschnitt daraus (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.2). Während sich die Gesamtansicht des Dendrogramms über eine Distanz von 0-800 erstreckt (Abb. 12 a), beschränkt sich der Ausschnitt auf den Distanzbereich von 0-1 (Abb. 12 b). Alle Pilze wurden in drei Parallelen kultiviert und analysiert. Wie erwartet, werden im Dendrogramm bis auf Pf a und Pf b (*Penicillium fellutanum*) alle Stämme als Tripletts wiedergegeben (Abb. 12 b), wobei die Distanz beim Stamm An (*Aspergillus niger*) maximal 0,4 beträgt, entsprechend einer Ähnlichkeit von wenigstens 99,95 %. Bei zwei der drei Isolate von *P. fellutanum* scheint die oben angedeutete Durchmischung vorzuliegen, weil die Tripletts von Pf a und Pf b im Dendrogramm nicht voneinander getrennt wurden. Isolat Pf c scheint dagegen ein von beiden abweichender Typ zu sein, da er als Triplett dargestellt wird. Aus der Tatsache, dass die anderen 27 Stämme bzw. Isolate als Tripletts auf sehr hoher Ähnlichkeitsstufe (entsprechend einer geringen Distanz) erscheinen, kann geschlossen werden, dass die Gesamtheit der in der Bildanalyse eingesetzten Messparameter auch beim Kameraabstand von 36 cm ausreichend differenzierende Daten liefert. Da 27 von 29 Pilzen als Tripletts wiedergegeben werden, kann von einer Trefferquote von mindestens 93,1 % ausgegangen werden. Unter der Voraussetzung, dass die beiden sich durchmischenden Tripletts von *P. fellutanum* tatsächlich einem Stamm angehören, darf sogar eine Trefferquote von 100 % angenommen werden.



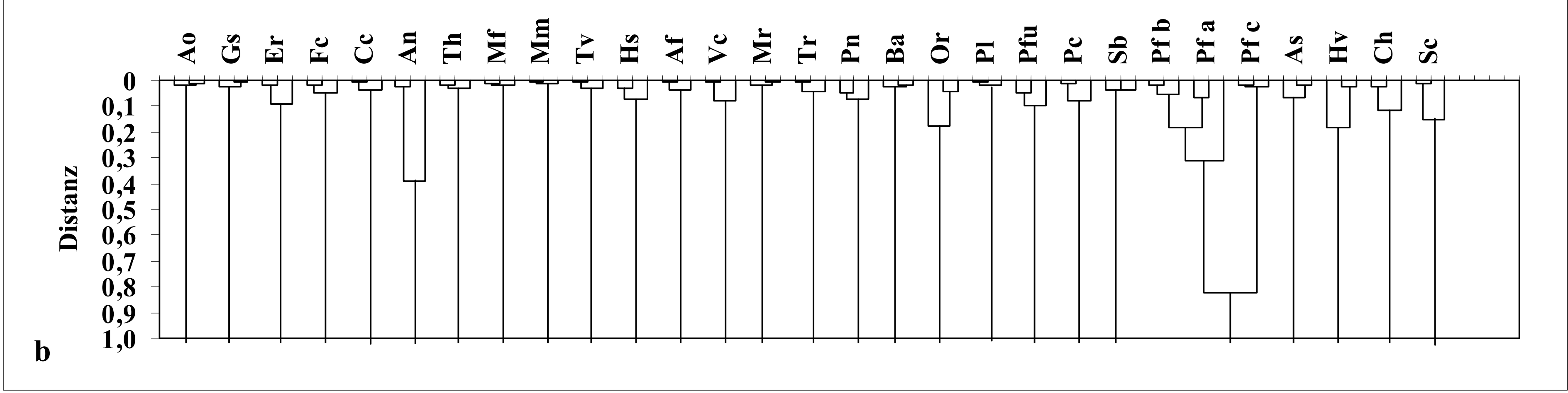


Abb. 12: Dendrogramm geclusterter Bildanalysedaten (Kameraabstand 36 cm; Daten s. im Anhang unter 7.2) von 29 Pilzstämmen à drei Parallelen (Namen s. Tab. 12). a: Gesamtansicht mit einem Distanzbereich von 0-800. b: Vergrößerungsausschnitt aus der Abbildung 12 a mit einem Distanzbereich von 0-1. Bis auf die Isolate Pf a und Pf b clustern alle Pilze als Tripletts. Reihenfolge der Parallelen von Pf a und Pf b im Dendrogramm (von links nach rechts): Pf a1, Pf b3, Pf b2, Pf a2, Pf a3, Pf b1.

Die Frage, welchen Anteil jeder der 20 Messparameter (Kap. 2.2.2.1.3) an dem in der Abbildung 12 gezeigten Differenzierungsergebnis tatsächlich hat, wurde zunächst durch eine Hauptkomponentenanalyse (*PCA*) der Bildanalysedaten der 29 Teststämme zu klären versucht. Bei diesem statistischen Verfahren wird die Korrelation der Messparameter untereinander, d.h. deren Bedeutung, in der Regel auf eine künstliche zweidimensionale Ebene projiziert. Diese Projektion erfolgt so, dass möglichst viele Parameter in der Nähe der beiden Hauptkomponenten liegen, also achsennah. Durch die Nähe zu den beiden Achsen wird nicht nur die Korrelation der Parameter zu den beiden Hauptkomponenten hergestellt, sondern auch die Korrelation der Messparameter untereinander ausgedrückt. Die Abbildung 13 zeigt, dass die 20 Messparameter überwiegend achsennah sowie kreisförmig angeordnet sind. Darüber hinaus lassen sich drei Gruppen von Parametern erkennen, eine rechts der y-Achse (I), eine links davon (II) sowie eine oberhalb der x-Achse (III). Gruppe I enthält Parameter für die Verteilung von Farben und Helligkeit (MP7-MP9 u. MP16-MP20), Gruppe II bilden eigentliche Farparameter (MP2-MP5 u. MP10-MP13) und in Gruppe III sind weitere Parameter für die Verteilung von Farben und Helligkeit mit dem linearen Wachstum zusammengefasst (MP1, MP6, MP14 u. MP15). Innerhalb der Gruppen I und II liegen einige Parameter übereinander bzw. dicht nebeneinander. Dies bedeutet, dass diese Parameterpaare (MP8 u. MP9, MP17 u. MP19, MP18 u. MP20 bzw. MP2 u. MP4, MP10 u. MP12) nicht nur sehr hoch miteinander korreliert sind, sondern auch jeweils eine fast identische Unterscheidungskraft haben müssen.

Eine weitergehende Information bezüglich der Unterscheidungskraft der 20 Messparameter ist der Hauptkomponentenanalyse nicht zu entnehmen, so dass zusätzliche Untersuchungen nötig sind. Zur Evaluierung jedes einzelnen Messparameters wurde die jeweils zugehörige Datenreihe aus der Bildanalyse mit den Datenreihen der 19 verbleibenden Messparameter korreliert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass bei völliger Gleichheit zweier Datenreihen bzw. wenn die eine Datenreihe ein Vielfaches der anderen ist, wenn also maximale Korrelation von 1 vorliegt, nur eine von beiden Datenreihen oder beide zur Hälfte zur Unterscheidung der zu untersuchenden Objekte beitragen. Umgekehrt ist davon auszugehen, dass bei einer geringen Korrelation beide Datenreihen in hohem Maße zur Unterscheidung beitragen. Eine hohe Summe aller 19 möglichen Korrelationen würde daher eine geringe, eine niedrige Summe dagegen eine hohe Unterscheidungskraft andeuten. Da die maximal mögliche Summe aller Korrelationen bei 20 Messparametern einen Wert von 19 annimmt, ließ sich aus der tatsächlichen Summe der messparameterspezifischen Korrelationen errechnen, welche

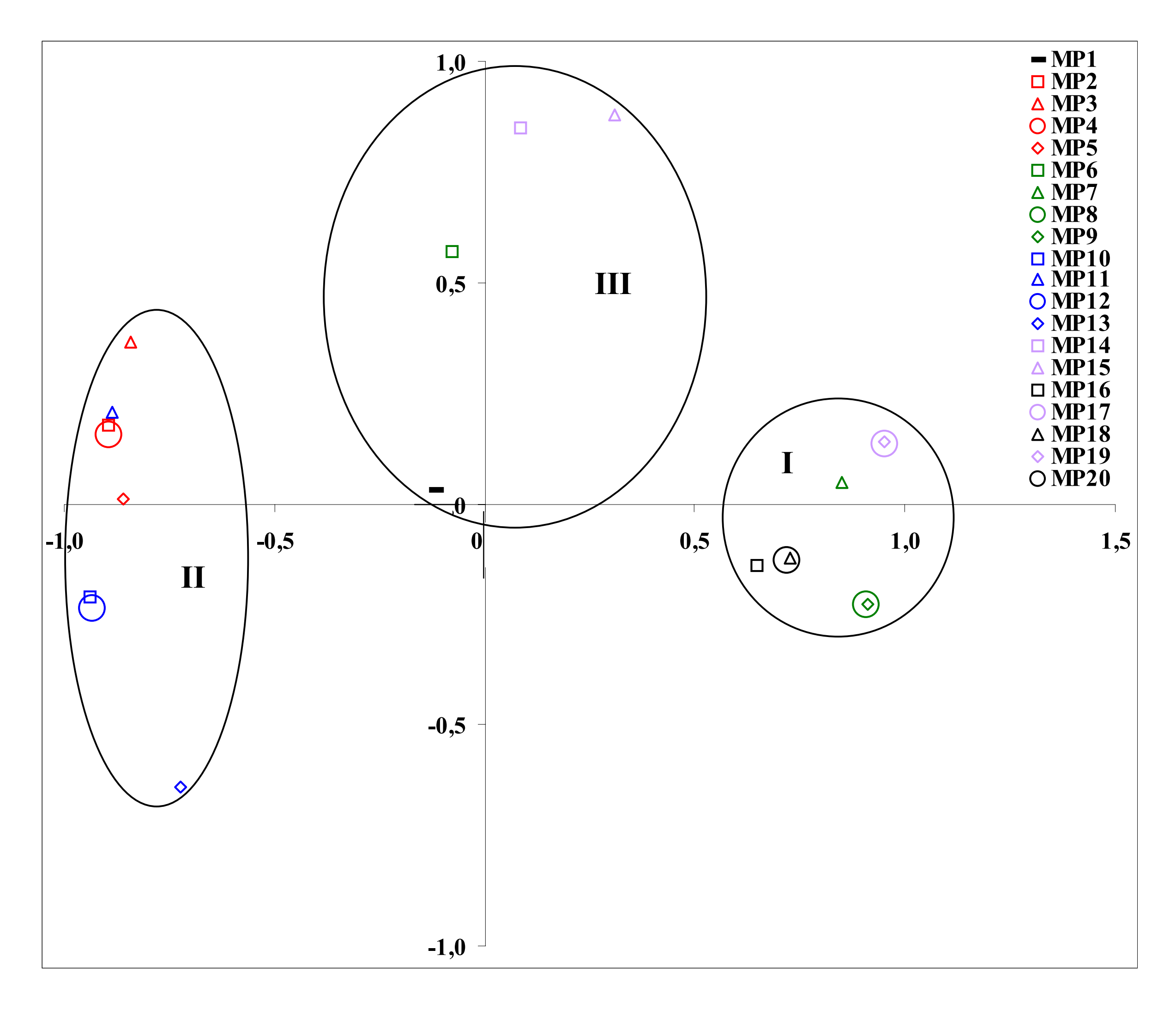


Abb. 13: Ermittlung der Differenzierungskraft der in der Bildanalysemethode verwendeten 20 Messparameter (MP, Kap. 2.2.2.1.3) innerhalb von 29 vermessenen Pilzstämmen (n = 3, Namen s. Tab. 12, Bildanalysedaten im Anhang unter 7.2) durch Hauptkomponentenanalyse (*PCA*). Darstellung: Abszisse = 1. Hauptkomponente, Ordinate = 2. Hauptkomponente; Gruppen von Parametern: I = Parameter für Verteilung von Farben und Helligkeit (MP7-MP9 u. MP16-MP20), II = eigentliche Farbparameter (MP2-MP5 u. MP10-MP13), III = lineares Wachstum u. Parameter für Verteilung von Farben und Helligkeit (MP1, MP6, MP14 u. MP15).

Lineares Wachstum in mm d^{-1} (MP1).

Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (MP2), *Mean Red* (MP3), *Mean Green* (MP4), *Mean Blue* (MP5), *Hue Typical* (MP6), *Mean Saturation* (MP7), *Mean Brightness* (MP8), *Mean Density* (MP9).

Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (MP10), *Mean Red* (MP11), *Mean Green* (MP12), *Mean Blue* (MP13), *Hue Typical* (MP14), *Mean Saturation* (MP15), *Gray Variation* (MP16), *Mean Brightness* (MP17), *Bright Variation* (MP18), *Mean Density* (MP19), *Density Variation* (MP20).

Unterscheidungskraft jeder Messparameter tatsächlich besitzt. Diese Berechnung erfolgte nach der Gleichung (11):

$$\text{Unterscheidungskraft}_{\text{Param}}\ [\%] = \frac{(n-1) - \sum_{\text{Kor}}}{n-1} \times 100 \qquad (11),$$

wobei n = Zahl der Messparameter

Σ_{Kor} = Summe der Korrelationen eines Messparameters mit den verbleibenden Messparametern.

Die Tabelle 23 zeigt die Reihenfolge der 20 Messparameter, wie sie sich bei aufsteigender Sortierung der Korrelationssummen (Spalte 2) bzw. absteigender Unterscheidungskraft ergibt. Aus dieser Reihenfolge ist die tatsächliche Unterscheidungskraft noch nicht abzulesen. Diese ergibt sich erst, wenn der Anteil der nicht korrelierten Messwerte nach Anwendung der obigen Gleichung (11) berechnet wird. Es zeigt sich dann, dass die Varianz der das Wachstum der Pilze (MP1) betreffenden Messwerte zu 88,21 % zur Unterscheidung der Pilze beiträgt, die Varianz des Farbparameters *Mean Density* der Kolonieunterseite (MP19) dagegen nur zu 32,95 %. Die hier durchgeführte Evaluierung der Messparameter fördert darüber hinaus das Verständnis der Hauptkomponentenanalyse in der Abbildung 10. Es ist zu erkennen, dass die vier am besten unterscheidenden Parameter (MP1, MP6, MP14 u. MP15) alle der Parametergruppe III angehören, die am stärksten mit der zweiten Hauptkomponente (y-Achse) korreliert ist, während die weniger gut unterscheidenden Parameter mit der ersten Hauptkomponente (x-Achse) korreliert sind. Es wird auch deutlich, dass die aufgrund der Hauptkomponentenanalyse als relativ schlecht zu bewertenden, deckungsgleichen bzw. eng benachbarten Parameter wenigstens mit etwa einem Drittel der Varianz ihrer Messwerte zur Unterscheidung der Pilze beitragen und auf keinen Fall weggelassen werden dürfen.

Tab. 23: Berechnung der Unterscheidungskraft der 20 in der Bildanalysemethode eingesetzten Messparameter (MP, Kap. 2.2.2.1.3) aus den jeweils 19 möglichen Korrelationen. Grundlage sind die Daten der in der Tabelle 12 genannten 29 Pilzstämme bzw. Isolate (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.2). Die am schlechtesten differenzierenden Parameter weisen immerhin eine Unterscheidungskraft von über 30 % auf und dürfen daher nicht weggelassen werden.

Messparameter*	Σ_{Kor}**	Σ_{Kor_max}-Σ_{Kor} (Unkorreliertheit)	Unterscheidungs-kraft$_{Param}$ [%]
MP1	2,24	16,76	88,21
MP6	2,95	16,05	84,47
MP14	3,82	15,18	79,89
MP15	5,13	13,87	73,00
MP16	8,84	10,16	53,47
MP20	9,80	9,20	48,42
MP18	9,89	9,11	47,95
MP13	10,37	8,63	45,42
MP3	10,94	8,06	42,42
MP5	11,18	7,82	41,16
MP7	11,28	7,72	40,63
MP11	11,50	7,50	39,47
MP2	11,53	7,47	39,32
MP4	11,61	7,39	38,89
MP8	11,94	7,06	37,16
MP9	11,96	7,04	37,05
MP12	12,53	6,47	34,05
MP10	12,55	6,45	33,95
MP17	12,72	6,28	33,05
MP19	12,74	6,26	32,95

*Lineares Wachstum in mm d^{-1} (MP1).
Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (MP2), *Mean Red* (MP3), *Mean Green* (MP4), *Mean Blue* (MP5), *Hue Typical* (MP6), *Mean Saturation* (MP7), *Mean Brightness* (MP8), *Mean Density* (MP9).
Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (MP10), *Mean Red* (MP11), *Mean Green* (MP12), *Mean Blue* (MP13), *Hue Typical* (MP14), *Mean Saturation* (MP15), *Gray Variation* (MP16), *Mean Brightness* (MP17), *Bright Variation* (MP18), *Mean Density* (MP19), *Density Variation* (MP20).
**Summe aller 19 Korrelationskoeffizienten (r) als Wurzeln aus den Bestimmtheitsmaßen.

Aus der Hauptkomponentenanalyse anderer Datensätze geht hervor, dass die Bedeutung der in der Bildanalyse eingesetzten Messparameter offensichtlich variieren kann. Die Abbildung 14 zeigt die Positionen der 20 verwendeten Messparameter, wie sie sich aus den Datensätzen von drei Stichproben aus einem schwermetallbelasteten Haldenboden ergeben haben. Es ist zu erkennen, dass die Parameter aus drei Stichproben durchaus auf drei Quadranten (Zählrichtung im Uhrzeigersinn von oben rechts nach oben links) verteilt sein können. Dies gilt z.B. für den MP1 (Wachstum), der in den Quadranten 2, 3 und 4 plaziert wurde oder für den MP6 und den MP7 in den Quadranten 1, 2 und 4. Dieser Sachverhalt unterstützt die

obige These, dass bei der Auswertung der Bildanalysedaten kein Messparameter weggelassen werden darf.

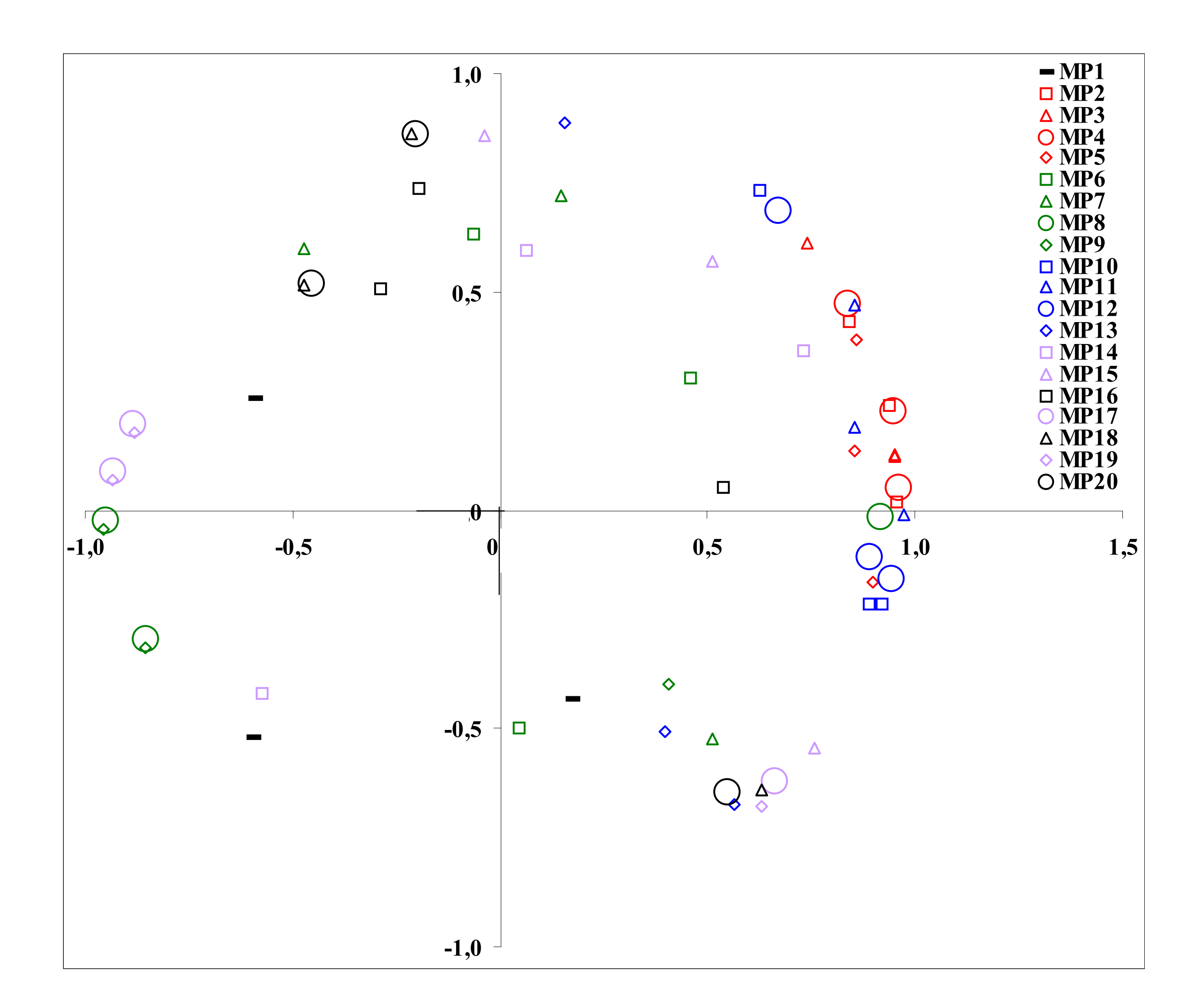


Abb. 14: Ermittlung der Differenzierungskraft der in der Bildanalysemethode verwendeten 20 Messparameter (MP, Kap. 2.2.2.1.3) innerhalb eines schwermetallbelasteten Haldenbodens durch Hauptkomponentenanalyse (*PCA*). Es wurden jeweils drei Stichproben zu etwa 130 Pilzisolaten untersucht (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.3 auf beiliegender CD). Die Differenzierungskraft der Parameter, dargestellt durch die Lage der Symbole im Diagramm, variiert in Abhängigkeit von der Stichprobe, was beweist, dass kein Parameter weggelassen werden darf. Darstellung: Abszisse = 1. Hauptkomponente, Ordinate = 2. Hauptkomponente.

Lineares Wachstum in mm d^{-1} (MP1).

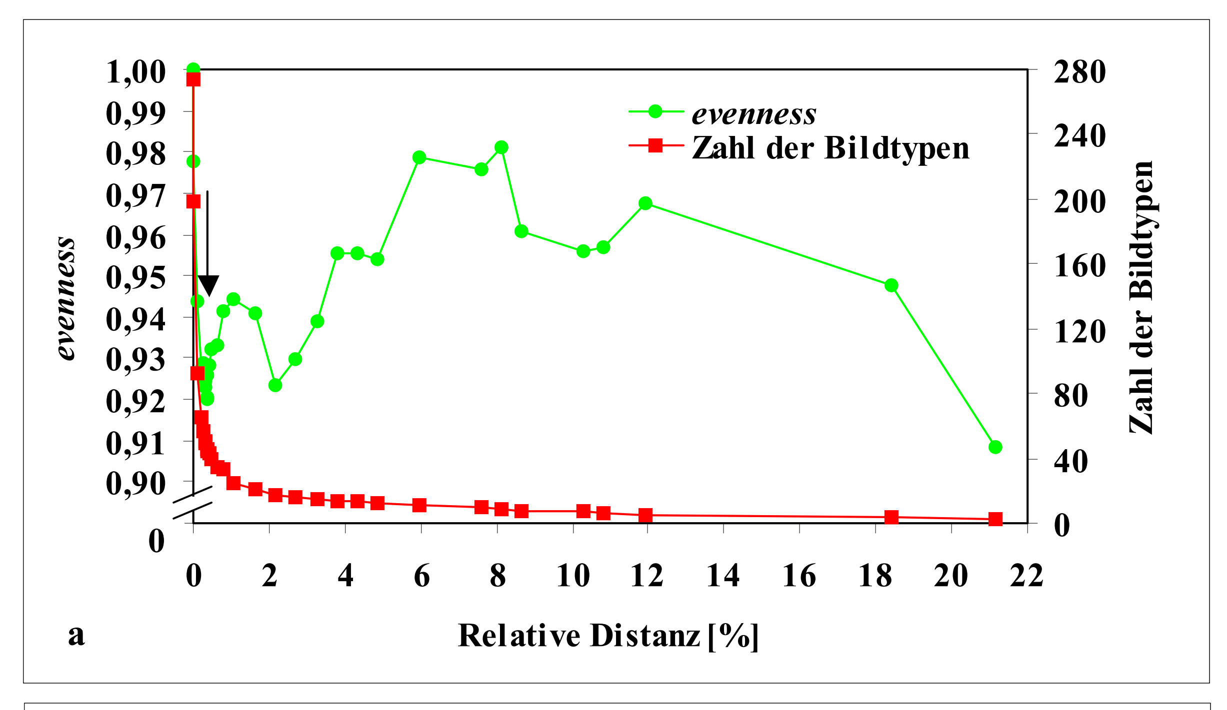
Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (MP2), *Mean Red* (MP3), *Mean Green* (MP4), *Mean Blue* (MP5), *Hue Typical* (MP6), *Mean Saturation* (MP7), *Mean Brightness* (MP8), *Mean Density* (MP9).

Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (MP10), *Mean Red* (MP11), *Mean Green* (MP12), *Mean Blue* (MP13), *Hue Typical* (MP14), *Mean Saturation* (MP15), *Gray Variation* (MP16), *Mean Brightness* (MP17), *Bright Variation* (MP18), *Mean Density* (MP19), *Density Variation* (MP20).

3.1.1.3 Suche nach der geeigneten Clusterebene

Aus der Tatsache, dass die Bilddaten der drei Isolate von *Penicillium fellutanum* auf einer höheren Distanzstufe (bei geringerer Ähnlichkeit) clusterten als die Daten der Dreifach-animpfungen (Tripletts) von 27 Vergleichsstämmen definierter Arten (Abb. 12), lässt sich ableiten, dass eine Distanzstufe, die der höchstmöglichen Ähnlichkeitsstufe (annähernd 100 %) entspricht, als Clusterebene ungeeignet ist. Da die Variabilität der zu einer Art gehörenden Stämme unbekannt ist, wäre es nicht gerechtfertigt, die Clusterebene *a priori* festzulegen. Vielmehr müsste diese, abhängig von der Variabilität der Arten in einer Gruppe zu differenzierender Pilze, für jede Gruppe neu ermittelt und festgelegt werden. Die Festlegung auf eine bestimmte (starre) Clusterebene und nicht auf eine Linie wechselnder Distanzen ist nötig, weil der Vorgang des Clusterns nicht auf einer Vordifferenzierung der Isolate nach wichtigen und einer Nachdifferenzierung nach weniger wichtigen Parametern beruht, sondern weil alle Parameter gleiches Gewicht haben. Diese Notwendigkeit führt dazu, dass beim Vorgang des Clusterns nicht generell Arten identifiziert werden können, sondern vielmehr Bildtypen unterschieden werden, die aber überwiegend Arten darstellen.

Bei der Suche nach einer geeigneten Clusterebene ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass in Stichproben aus mikrobiellen Gemeinschaften in der Regel nur wenige Arten in großer Zahl auftreten, relativ viele Arten dagegen oft nur durch ein Individuum vertreten sind, so dass die *evenness* der Artenverteilung einen Wert < 1 annehmen muss. Eine *evenness* von 1 ergäbe sich dagegen, wenn die Daten der in der Abbildung 12 dargestellten Pilze auf einer Ähnlichkeitsstufe von 99,95 %, d.h. auf der Ebene der Tripletts, geclustert würden. Die Gruppe der drei zu *P. fellutanum* gehörenden Isolate wäre in diesem Fall zerschnitten. Es lag nahe, die *evenness* der Verteilung von Bildtypen, wie sie sich in einem Dendrogramm in Abhängigkeit der verschiedenen Distanzstufen ergibt, zu untersuchen. Da die Distanz in Dendrogrammen kein Kontinuum darstellt, sondern von den Knotenpunkten abhängt, wurden in einem Dendrogramm der Bilddaten von Isolaten aus belastetem und wenig belastetem Boden für bestimmte Knoten Zahl und Größe der entsprechenden Bildtypen abgelesen und daraus die zugehörige *evenness* berechnet. Die Abbildung 15 zeigt, dass die *evenness* mit zunehmender relativer Distanz drei Minima aufweist. Von diesen erfüllt nur das erste ($e = 0{,}92$ bei einer relativen Distanz von 0,35 %; Pfeil) die Bedingung des Nebeneinanders von Bildtypengruppen (Cluster) und Einzelisolaten. Bei diesem ersten Minimum wurden noch sieben Einzelisolate gezählt, während das größte Cluster 21 Isolate enthielt. Im Fall der beiden anderen Mini-



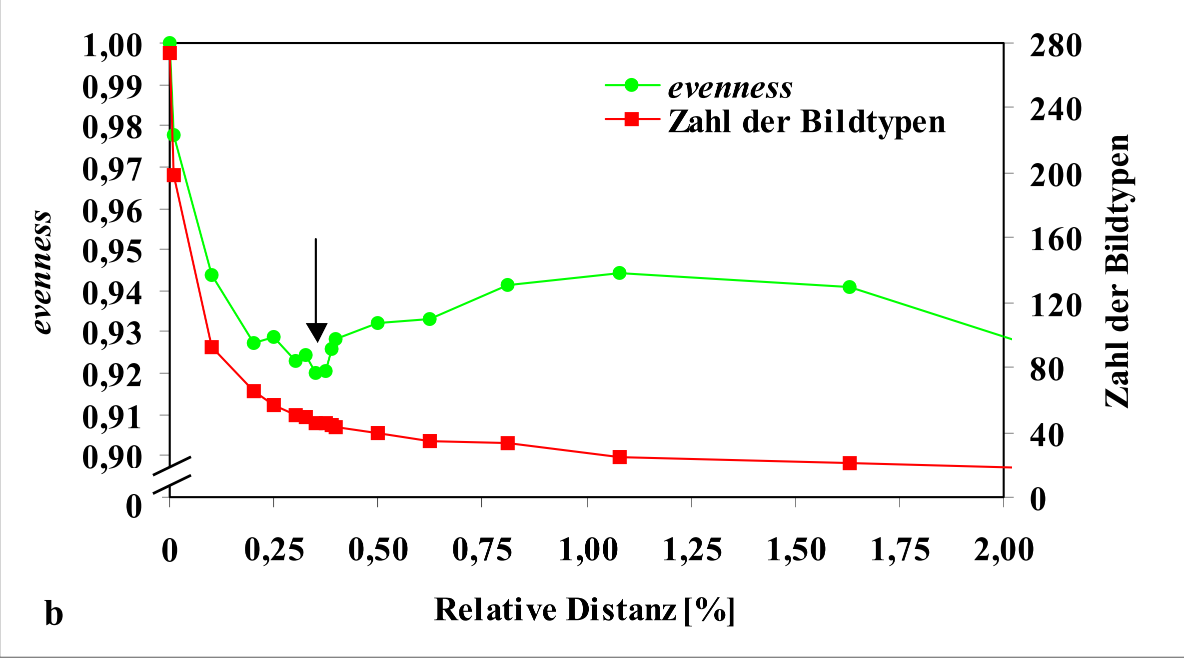


Abb. 15: Ermittlung der geeigneten Clusterebene durch Gegenüberstellung von relativer Distanz [%] in Dendrogrammen und der *evenness* der Verteilung von Bildtypen in einer Stichprobe. In diesem Beispiel wurden Bildanalysedaten einer Gruppe von 274 Pilzisolaten aus Bodenpaar I geclustert (132 Isolate aus wenig belastetem Ackerboden u. 142 Isolate aus belastetem Ackerboden, s. Anhang unter 7.3 bzw. beiliegende CD). Das zugehörige Dendrogramm war wegen seiner Größe nicht darstellbar und wurde nur am Bildschirm ausgewertet. a: Gesamtansicht mit einem relativen Distanzbereich von 0-22 %. Die geeignete Clusterebene fällt mit dem ersten Minimum der *evenness* (Pfeil) zusammen, von der geringsten relativen Distanz aus betrachtet. b: Vergrößerungsausschnitt aus der Abbildung 15 a mit einem relativen Distanzbereich von 0-2 %.

ma ist nicht nur die Zahl der Cluster und Einzelisolate zunehmend geringer, sondern auch die Zahl der Individuen je Cluster zunehmend größer.

Die durch das erste Minimum der *evenness* charakterisierte Clusterebene ist nicht nur an den jeweiligen Datensatz angepasst, sondern auch für alle Datensätze reproduzierbar und scheint daher weniger willkürlich zu sein als *a priori* festgelegte Ähnlichkeitsstufen. Da aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass Datensätze verschiedener Herkunft auch bei der genannten Vorgehensweise zu voneinander abweichenden Clusterebenen führen, erschien es sinnvoll, die Datensätze von Pilzen aus zu vergleichenden Gemeinschaften zu vereinigen und, wie in der Abbildung 12 gezeigt, auf einer gemeinsamen Ebene zu clustern. Die Bestimmung der Typenzahl je Stichprobe erfordert dann lediglich die nachfolgende Trennung der Cluster entsprechend der Herkunft der Isolate. Die Vorgehensweise in dieser Arbeit erfolgte immer nach diesem Schema.

3.1.2 Entwicklung einer Methode zur Abschätzung der Wirkung von Schwermetallstress auf die Biomasse von Pilzkolonien durch bildanalytische Bestimmung von Koloniefläche und Koloniedichte

Die Abschätzung der Diversität von Pilzen durch Bildanalyse schloss die Messung des Wachstums als wichtiges Unterscheidungsmerkmal ein. Da sich Stress meist in einer Reduktion des Wachstums äußert, lag es nahe, auch den Einfluss von Schwermetallen auf das Wachstum von Pilzen bildanalytisch zu untersuchen. Vorversuche hatten gezeigt, dass dabei nicht nur das Längenwachstum, erkennbar an einer reduzierten Koloniefläche, sondern auch die Koloniedichte, ersichtlich an einer erhöhten Lichtdurchlässigkeit, d.h. an einer reduzierten Extinktion, in Mitleidenschaft gezogen wird. Es wurde angenommen, dass das Produkt beider Größen ein besseres Bild von der Wirkung eines Stressors ergibt als jede für sich allein, so dass es sinnvoll erschien, mit der Messung von Koloniefläche und -dichte Veränderungen der relativen Biomasse abschätzen zu können. Biomasseveränderungen können in der Regel nur durch Wägen des in Flüssigkulturen gebildeten Myzels ermittelt werden, eine Methode, die arbeitsaufwändig und wenig reproduzierbar ist.

Bei der Bestimmung der Koloniefläche wurde die im Bildanalyseprogramm *Lucia* verfügbare Messfunktion *Area* nach Kalibration mit Millimeterpapier verwendet (Kap. 2.2.2.1.3). Die Abschätzung der Koloniedichte erfolgte unter Verwendung der Messfunktion

Mean Gray im Durchlicht. Dabei wurde die Extinktion des Lichts durch die Kolonie aus der Differenz zwischen der Lichtdurchlässigkeit (als Grauwert) der unbeimpften Agarplatte (Agar + Petrischale; hoher Wert) und der Lichtdurchlässigkeit der beimpften Agarplatte (Agar + Petrischale + Kolonie; niedriger Wert) errechnet. Da bei diesen Messungen die Dicke der Agarschicht eine kritische Größe war, wurden die Kunststoffpetrischalen mit exakt 20 ml Agarmedium (Tab. 5) beschickt. Methodische Probleme bei diesen Messungen ergaben sich aus zwei Tatsachen: während die Lichtdurchlässigkeit der Pilzkolonien als Folge der Belastung zunahm, wurde das Medium durch die Schwermetallbelastung trüber und damit dunkler. Dies bedeutete nicht nur, dass zu jeder Belastungsstufe die Lichtdurchlässigkeit der beimpften und die der unbeimpften Petrischale gemessen werden musste, sondern auch, dass die maximal gestressten Kolonien wegen ihrer geringeren optischen Dichte vom Bildanalyseprogramm nicht immer voll erkannt wurden, so dass die anzuwendende Beleuchtungsstärke verringert, d.h. an die gestressten und nicht an die ungestressten Kolonien angepasst werden musste. Bei dieser Anpassung war die Schließung der Blende um eine Stufe (5,6 $\rightarrow$ 8) in der Regel ausreichend.

Die oben beschriebene Vorgehensweise ist in der Tabelle 24 am Beispiel von je zwei mutmaßlich toleranten/resistenten und sensitiven Isolaten von *Penicillium fellutanum* aus Halden- und Waldboden dargestellt. Daten zur absoluten und relativen Koloniefläche gehen aus den ersten beiden Zeilenblöcken hervor. Um die Lichtdurchlässigkeit der unbeimpften Agarplatten möglichst genau zu bestimmen, wurden je Belastungsstufe zehn Parallelen vermessen. Der dritte Zeilenblock macht deutlich, dass die dabei auftretende Standardabweichung im Durchschnitt nur etwa 1 % beträgt. Der vierte Zeilenblock enthält die je nach Belastung ermittelten Grauwerte der beimpften Petrischalen. Die Extinktionswerte in Block 5 ergeben sich aus der Differenz der in Block 3 und 4 aufgeführten Grauwerte. Ihre Relativierung führt zu den in Zeilenblock 6 angegebenen Werten. Das Produkt der relativen Werte aus Block 2 und 6 stellt die relative Biomasse der vier Testpilze unter dem Einfluss des verwendeten Schwermetalls (Kupfer) dar (Block 7). Es ist zu erkennen, dass die relative Biomasse den Schwermetalleffekt auf das Wachstum von Pilzen schon bei geringerer Belastung des Mediums anzeigt als die Koloniefläche. Auch Unterschiede in der Toleranz/Resistenz der vier Testpilze werden durch Abschätzung der relativen Biomasse schon in der ersten Belastungsstufe (1 mM) deutlicher sichtbar als durch Messung von Koloniefläche bzw. Koloniedichte allein.

Tab. 24: Einfluss der Kupferkonzentration auf die Koloniegröße und die Koloniedichte (Extinktion) von Isolaten von *P. fellutanum* aus Halden- (H) und Waldboden (W). Aufgeführt sind die Koloniefläche (absolut und relativ), die gemessenen Grauwerte (*Mean Gray*) unbeimpfter und beimpfter Petrischalen sowie die davon abgeschätzte Extinktion (absolut und relativ). Die relative Biomasse zeigt Unterschiede hinsichtlich der Toleranz/Resistenz der Pilze bei geringer Belastung besser an als die Koloniefläche bzw. -dichte allein.

Fläche	Pilz-Nr.	Kupfer im Nährboden [mM]			
		0	1	2	4
[mm^2]	H248	393,8	209,7	116,0	54,8
	H275	462,2	273,8	162,1	54,7
	W370	383,5	216,7	47,0	12,2
	W378	508,7	247,7	49,5	14,5
relativ	H248	1	0,533	0,295	0,139
	H275	1	0,592	0,351	0,118
	W370	1	0,565	0,123	0,032
	W378	1	0,487	0,097	0,029
Mean Gray					
unbeimpfte Petri-schale, n = 10		239,5 ± 0,5	231,2 ± 2,4	227,9 ± 1,7	220,2 ± 4,4
beimpfte Petrischale	H248	40	30	20	41
	H275	42	33	31	45
	W370	40	146	191	195
	W378	39	125	196	200
Extinktion					
Differenz zwischen unbeimpft und beimpft	H248	199,5	201,2	207,9	179,2
	H275	197,5	198,2	196,9	175,2
	W370	199,5	85,2	36,9	25,2
	W378	200,5	106,2	31,9	20,2
relativ	H248	1	1,009	1,042	0,898
	H275	1	1,004	0,997	0,887
	W370	1	0,427	0,185	0,126
	W378	1	0,530	0,159	0,101
Relative Biomasse					
Produkt aus relativer Fläche und relativer Extinktion	H248	1	0,537	0,307	0,125
	H275	1	0,595	0,350	0,105
	W370	1	0,241	0,023	0,004
	W378	1	0,258	0,015	0,003

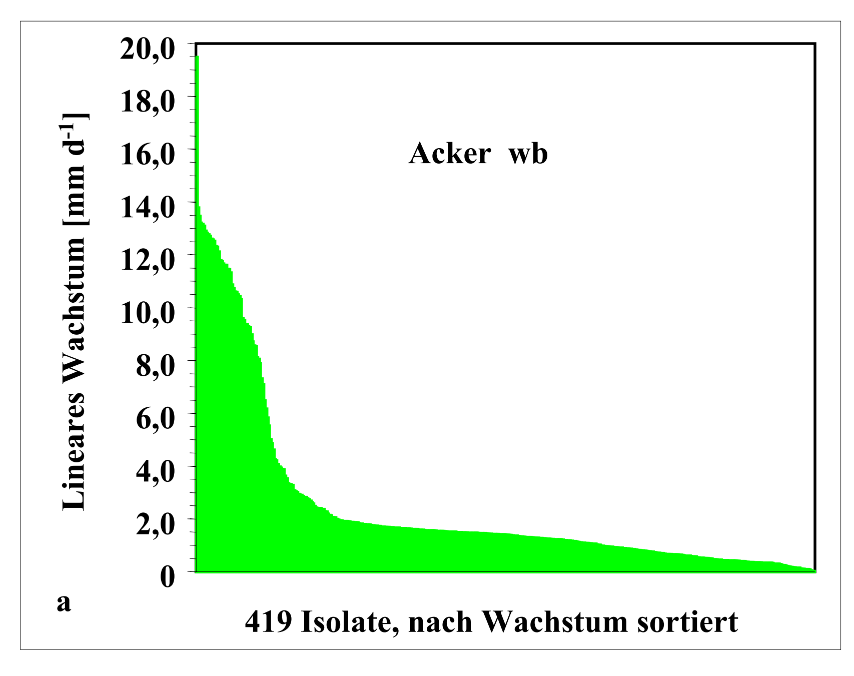
3.2 Wirkung von Schwermetallen auf Bodenpilze auf der Gemeinschaftsebene

3.2.1 Wirkung auf die Diversität von Pilzgemeinschaften

3.2.1.1 Verteilung der Wuchsleistungen von Pilzen in Acker- und Naturböden

Die Erfassung der Bilddaten aller Pilzisolate schloss die Bestimmung ihres linearen Wachstums ein (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.3, s. beiliegende CD). Es lag daher nahe, mögliche Unterschiede zwischen den vier Pilzgemeinschaften auch hinsichtlich des Wachstums zu ermitteln. Von dieser Analyse wurde erwartet, dass nicht nur Unterschiede auf der Gemeinschaftsebene, sondern auch auf der Artebene sichtbar würden.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Verteilung der Wachstumsraten von etwa 400 Pilzisolaten je Boden. Besonders auffallend sind die Unterschiede innerhalb des Bodenpaars I (Abb. 16). Während im wenig belasteten Acker etwa 15 % der Isolate schneller als 4 mm d^{-1} wuchsen, war dieser Anteil im belasteten Acker geringer als 4 %. Interessant, wenn auch statistisch nicht gesichert, ist das einmalige Auftreten eines Isolats mit 19 mm d^{-1} Wuchsleistung im wenig belasteten Acker, während das schnellstwüchsige Isolat aus dem belasteten Boden nur eine tägliche Wuchsleistung von etwa 13 mm zeigte. In den beiden Naturböden waren die Unterschiede ähnlich, wenn auch nicht so ausgeprägt (Abb. 17). Während im Waldboden etwa 4 % der Pilze schneller als 4 mm d^{-1} wuchsen, waren es im Haldenboden nur 3 %. Dafür ist der Anteil der schneller als 10 mm d^{-1} wachsenden Pilze im Waldboden deutlich höher als im Haldenboden.



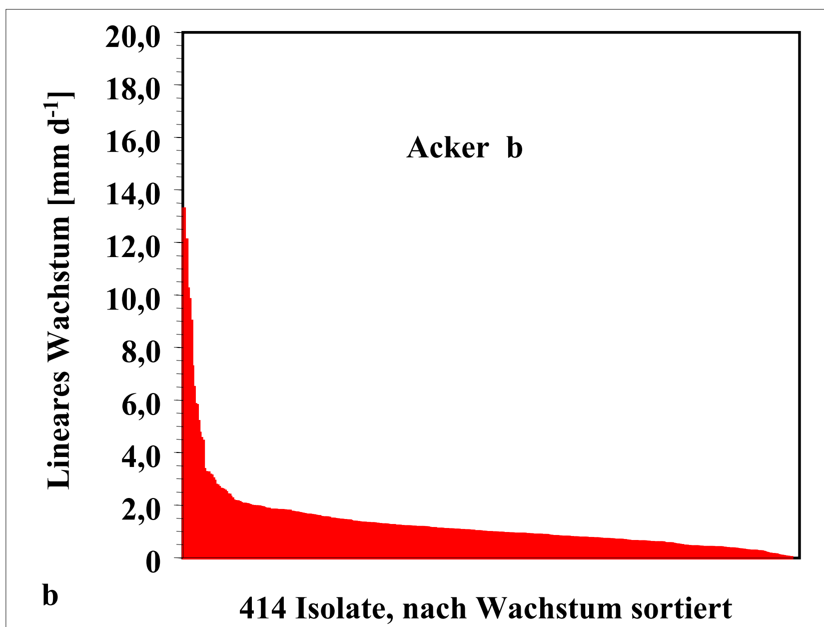
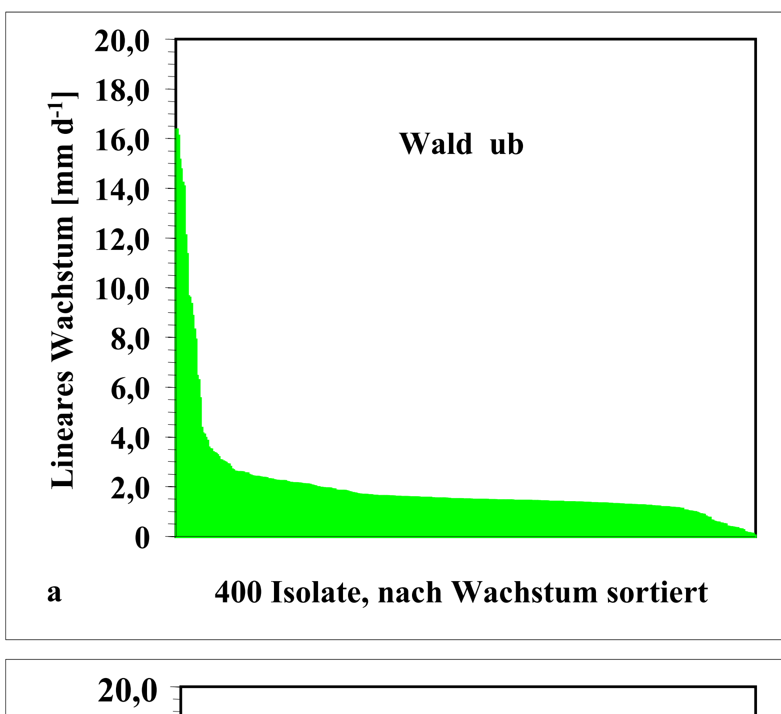


Abb. 16: Einfluss von Schwermetallen auf die Wuchsleistung von Bodenpilzen in Ackerböden (Bodenpaar I). a: Ackerboden wenig belastet (wb). b: Ackerboden belastet (b). Pilze aus wenig belastetem Ackerboden weisen eine höhere durchschnittliche Wuchsleistung als die aus belastetem Ackerboden auf. Wachstumsdaten aller Isolate im Anhang unter 7.3 (s. beiliegende CD).



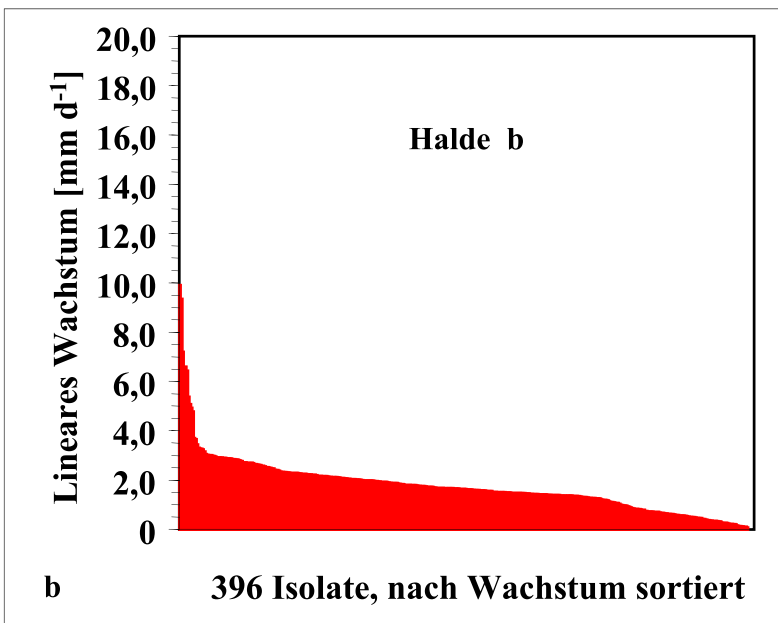


Abb. 17: Einfluss von Schwermetallen auf die Wuchsleistung von Bodenpilzen in sauren Naturböden (Bodenpaar II). a: Waldboden unbelastet (ub). b: Haldenboden belastet (b). Pilze aus unbelastetem Waldboden weisen eine höhere durchschnittliche Wuchsleistung als die aus belastetem Haldenboden auf. Wachstumsdaten aller Isolate im Anhang unter 7.3 (s. beiliegende CD).

Die in den Abbildungen 16 und 17 zutage tretenden Unterschiede zwischen den Pilzgemeinschaften werden noch deutlicher, wenn der Durchschnittswert, die mittlere Abweichung davon und der Variationskoeffizient der Wachstumsraten der Pilze aus den drei einzelnen Stichproben je Boden betrachtet werden. Es zeigt sich dann, dass das durchschnittliche Wachstum der Pilze in der Reihenfolge Acker wb > Wald ub > Halde b > Acker b abnimmt

(Tab. 25). Dabei sind die Unterschiede zwischen Acker wb und den drei anderen Böden, zwischen Acker b und den drei anderen Böden sowie der Unterschied zwischen Wald ub und Acker b gesichert (p = 0,05), der Unterschied zwischen den Naturböden (Wald ub u. Halde b) dagegen nicht.

Da, wie schon dargelegt wurde (Kap. 2.2.4), eine große Variation der Wachstumsraten der aus einem Boden isolierten Pilze ein Indikator für deren Diversität darstellt, wurden für die jeweils drei Stichproben aus den vier Böden die Variationskoeffizienten des Wachstums errechnet. Wie die Tabelle 25 zeigt, nimmt der mittlere Variationskoeffizient des Wachstums in der Reihenfolge Acker wb > Acker b > Wald ub > Halde b ab. Wie beim durchschnittlichen Wachstum sind die Unterschiede zwischen Acker wb und den anderen Böden sowie zwischen Acker b und Halde b gesichert (p = 0,05), dagegen nicht die Unterschiede zwischen Wald ub und Acker b bzw. Halde b.

Tab. 25: Einfluss von Schwermetallstress auf den Variationskoeffizienten des linearen Wachstums von Pilzisolaten aus belasteten und unbelasteten Böden (*LSD*; p = 0,05; n = 3). Zwischen den Ackerböden waren die Unterschiede signifikant, nicht aber zwischen Wald- und Haldenboden. Die Wachstumsdaten aller Isolate befinden sich im Anhang unter 7.3 (s. beiliegende CD).

	Acker wb*	Acker b*	Wald ub**	Halde b**
Versuch 1: Anzahl Isolate	132	142	126	129
Durchschnittswert (DW; [mm d^{-1}])	2,505	1,096	1,998	1,729
Mittlere Abweichung (MA)	2,431	0,675	1,079	0,663
Variationskoeffizient (MA/DW)	0,970	0,616	0,540	0,383
Versuch 2: Anzahl Isolate	141	137	133	132
Durchschnittswert (DW; [mm d^{-1}])	2,397	1,377	1,867	1,887
Mittlere Abweichung (MA)	2,023	0,692	0,661	0,897
Variationskoeffizient (MA/DW)	0,844	0,503	0,354	0,475
Versuch 3: Anzahl Isolate	146	135	141	135
Durchschnittswert (DW; [mm d^{-1}])	2,330	1,381	2,038	1,588
Mittlere Abweichung (MA)	1,905	0,970	1,275	0,578
Variationskoeffizient (MA/DW)	0,817	0,702	0,625	0,364
Versuche gesamt: Anzahl Isolate	419	414	400	396
Mittelwert (MW) der Durchschnittswerte (DW; [mm d^{-1}])	$2{,}411_c$ ± 0,088	$1{,}285_a$ ± 0,163	$1{,}968_b$ ± 0,089	$1{,}735_b$ ± 0,150
Mittelwert (MW) der Variationskoeffizienten (MA/DW)	**$0{,}877_c$** ± 0,082	**$0{,}607_b$** ± 0,100	**$0{,}506_{ab}$** ± 0,139	**$0{,}407_a$** ± 0,059

*Bodenpaar I, wb = wenig belastet, b = belastet.
**Bodenpaar II, ub = unbelastet, b = belastet.

3.2.1.2 Wirkung von Schwermetallen auf die strukturelle Diversität der Pilze in Acker- und Naturböden

Nach Atlas (1984) verlieren Mikroorganismengemeinschaften unter Stress Arten, ein Vorgang, der sich durch eine Verringerung der Diversität äußert. Aufgrund des geringeren Variationskoeffizienten des Wachstums der Pilze aus den Schwermetallvarianten der beiden Bodenpaare war zu erwarten, dass auch die Vielfalt der Pilze als Folge von Schwermetall-stress abnehmen würde. Wie in Kapitel 2.2.2.1.3 erläutert, wurde diese Eigenschaft der vier untersuchten Pilzgemeinschaften bildanalytisch ermittelt (Bildanalysedaten im Anhang unter 7.3, s. beiliegende CD). Da der *Shannon-Index* der Diversität (Shannon und Weaver, 1969) von der Größe der Stichprobe abhängt, wurde hier auf seine Bestimmung verzichtet und die Zahl der Bildtypen in einer definierten Zahl von Isolaten durch *rarefaction* errechnet (Kap. 2.2.4).

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in der Tabelle 26 zusammengestellt. Wie der Variationskoeffizient des Wachstums (Tab. 25) nahm die auf gleiche Stichprobengröße bezogene Zahl der Bildtypen in der Reihenfolge Acker wb > Acker b > Wald ub > Halde b ab. Im Gegensatz zu dem erstgenannten Versuch waren die Unterschiede zwischen den jeweiligen Belastungsstufen der beiden Bodenpaare aber nicht signifikant. Nur zwischen den beiden Ackerböden einerseits und dem Haldenboden andererseits war der Unterschied in der Zahl der Bildtypen je 125 Isolate gesichert. Dies gilt allerdings nur, wenn die Mittelwerte und Standardabweichungen von Wald und Halde miteinander verglichen werden. Vergleicht man dagegen die zu jeweils gleichen Zeitpunkten ermittelten Werte für Wald und Halde, so erscheinen die Unterschiede als gesichert, da die Variante Wald immer höhere Bildtypenzahlen als Halde lieferte. Dagegen führt die gleiche, auf den Versuchszeitpunkt bezogene Betrachtungsweise bei Vergleich der beiden Ackerböden nicht zu gesicherten Unterschieden. Auffallend ist, dass die Variationskoeffizienten der Bildtypenzahlen in den jeweils unbelasteten Varianten der beiden Bodenpaare etwas mehr als doppelt so hoch sind wie die der belasteten Varianten.

Tab. 26: Einfluss von Schwermetallen auf die Zahl der Bildtypen in jeweils 125 Pilzisolaten aus zwei Bodenpaaren (*LSD*; p = 0,05; n = 3). Zwischen den jeweiligen Belastungsstufen der Bodenpaare waren die Unterschiede nicht signifikant, jedoch zeigte der Variationskoeffizient der Zahl der Bildtypen deutliche Unterschiede an. Die Bildanalysedaten aller Isolate befinden sich im Anhang unter 7.3 (s. beiliegende CD).

	Acker wb*	Acker b*	Wald ub**	Halde b**
Versuch 1: Anzahl Isolate	132	142	126	129
Zahl der Bildtypen/125 Isolate	43,282	34,962	29,924	25,715
Versuch 2: Anzahl Isolate	141	137	133	132
Zahl der Bildtypen/125 Isolate	41,334	38,141	30,360	23,829
Versuch 3: Anzahl Isolate	146	135	141	135
Zahl der Bildtypen/125 Isolate	31,345	33,455	40,964	28,307
Versuche gesamt: Anzahl Isolate	419	414	400	396
Zahl der Bildtypen/125 Isolate+	**38,654$_{bc}$**	**35,519$_{bc}$**	**33,750$_{ac}$**	**25,950$_{a}$**
	± 6,404	± 2,393	± 6,252	± 2,248
Variationskoeffizient (SD/MW)	**0,166**	**0,067**	**0,185**	**0,087**

*Bodenpaar I, wb = wenig belastet, b = belastet.
**Bodenpaar II, ub = unbelastet, b = belastet.
+Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) aller drei Versuche.

3.2.2 Einfluss von Schwermetallen auf die katabolische Vielseitigkeit von Pilzgemeinschaften

3.2.2.1 Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit schwermetallgestresster Pilzgemeinschaften im Boden durch Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*)

Wie in Kapitel 2.2.2.2.1 dargelegt, kann die katabolische Vielseitigkeit einer Mikroorganismengemeinschaft im Boden durch Bestimmung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) abgeschätzt werden, da Aromaten hinsichtlich ihrer Qualität als Kohlenstoff (C)- und Energiequellen große Unterschiede aufweisen. Die Berechnung von Indices wurde in Kapitel 2.2.4 ausführlich dargestellt. Die Tabellen 27 und 28 zeigen relative Werte der Verteilung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) und daraus errechnete Indices. Wie die jeweils letzte Spalte zeigt, sind bei Betrachtung der Mittelwerte und zugehöriger Standardabweichungen Veränderungen auf der Seite der Fähigkeiten als Folge von Schwermetallstress nur in wenigen Fällen gesichert. So nahm in den Ackerböden die Fähigkeit zur Nutzung von 3-Hydroxybenzoat, Phenylalanin und Gentisat zu, die Nutzung von Veratrat (2,4-Dimethoxybenzoat) dagegen ab. Andererseits wurden in den Naturböden als Folge von Schwermetallstress nur das Testsubstrat 3-Hydroxybenzoat stärker und die Substrate 2-Hy-

droxybenzoat (Salicylsäure), 2-Aminobenzoat, Veratrat und 4-Methoxycinnamat weniger genutzt. Ein stringenterer Vergleich der Ergebnisse, d.h. die Betrachtung von Proben gleicher Entnahmezeitpunkte unter Berücksichtigung des durch Streuung der *CFU* bedingten Messfehlers, zeigt nur noch hinsichtlich der Nutzung von 4-Methoxycinnamat in den Naturböden einen gesicherten Unterschied in den substratspezifischen Vermehrungseinheiten an.

Tab. 27: Berechnung der katabolischen Vielseitigkeit von Bodenpilzen in Ackerböden aus der relativen Verteilung [%] aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) (*LSD*; p = 0,05; n = 10 Platten, 3 Versuche). Unterschiede zwischen den Ackerböden waren nicht signifikant.

	Bedeutungswerte [%][*]										
	Acker wb[**]					**Acker b[**]**					
Substrat \ Versuch-Nr.	1	2	3	MW		1	2	3	MW		+/-[***]
Hippurat	9,19±1,39	12,54±2,23	9,16±1,74	10,30	±1,95	7,61±1,29	8,24±1,98	9,71±0,90	8,52	±1,08	
4-Hydroxybenzoat	5,75±2,11	10,61±2,67	10,54±1,26	8,97	±2,79	8,66±1,27	9,50±0,95	10,58±0,90	9,58	±0,96	
4-Hydroxycinnamat	9,04±0,98	8,26±2,09	7,31±1,12	8,20	±0,87	7,48±1,07	6,41±1,70	5,14±0,79	6,34	±1,17	
3-Hydroxybenzoat	8,56±1,48	7,08±2,09	7,43±1,39	7,69	±0,77	10,82±1,26	9,83±1,63	10,21±1,34	10,28	±0,50	(+)
Phenylalanin	6,31±1,12	7,47±1,65	7,34±1,50	7,04	±0,63	8,95±1,56	8,73±1,54	9,69±1,87	9,12	±0,50	(+)
Phenylacetat	7,11±1,09	5,75±1,14	6,08±1,12	6,32	±0,71	5,74±0,94	6,39±0,84	5,33±1,04	5,82	±0,53	
Benzoat	6,97±1,68	5,75±1,42	6,05±1,12	6,26	±0,63	5,20±0,71	5,64±0,77	5,57±1,00	5,47	±0,24	
Veratrat	6,11±1,26	6,33±1,56	5,99±1,19	6,14	±0,17	4,38±1,00	4,54±0,85	5,18±0,55	4,70	±0,42	(-)
2,4-Dihydroxybenzoat	5,12±0,79	6,79±0,79	6,51±0,75	6,14	±0,90	6,43±1,19	5,75±0,99	5,78±1,76	5,99	±0,38	
2-Hydroxybenzoat	5,80±0,90	5,58±1,24	6,33±1,34	5,90	±0,39	6,92±0,92	6,35±0,81	5,55±0,61	6,27	±0,69	
Cinnamat	3,04±0,66	4,40±1,04	10,14±2,02	5,86	±3,77	4,19±1,05	4,23±0,63	3,97±1,12	4,13	±0,14	
2-Aminobenzoat	4,66±0,87	5,40±0,99	5,65±1,19	5,24	±0,51	4,90±0,99	4,87±1,16	5,03±0,76	4,93	±0,08	
Mandelat	6,46±0,64	3,54±0,49	4,09±1,01	4,69	±1,55	4,00±1,01	3,50±0,88	3,00±0,58	3,50	±0,50	
4-Aminobenzoat	4,72±0,72	4,47±1,33	0,00	3,06	±2,66	4,49±1,09	5,07±1,22	3,63±0,81	4,39	±0,73	
Gentisat	3,67±0,94	1,75±0,52	3,41±0,77	2,94	±1,04	4,72±0,63	6,52±1,10	5,78±1,06	5,67	±0,91	(+)
2,6-Dihydroxybenzoat	4,75±1,02	1,89±0,70	1,90±0,87	2,85	±1,65	2,77±0,37	1,92±0,68	3,09±1,00	2,59	±0,60	
4-Methoxycinnamat	2,73±0,59	2,39±0,45	2,06±0,70	2,39	±0,34	2,75±0,90	2,49±0,94	2,76±0,36	2,67	±0,15	
Anisat	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	
Phthalat	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	
Terephthalat	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	
Nicotinat	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±0,00	
Summe aller *CFU* ($\times 10^3$)	703	560	651			954	907	927			
evenness	0,9138	0,8933	0,8833	**0,90$_a$**	**±0,016**	0,9083	0,9064	0,9022	**0,91$_a$**	**±0,003**	
Durchschnittswert (DW)	4,76	4,76	4,76			4,76	4,76	4,76			
Mittlere Abweichung (MA)	2,29	2,78	2,99	2,69	±0,36	2,39	2,49	2,52	2,47	±0,07	
Katabolische Vielseitigkeit	2,08	1,71	1,59	**1,80$_a$**	**±0,25**	1,99	1,91	1,89	**1,93$_a$**	**±0,05**	

[*]Bedeutungswerte = aromatenspezifische *CFU*/Summe aller *CFU*.
[**]wb = wenig belastet, b = belastet.
[***]+/-: Veränderung infolge Schwermetallstress nur bei Betrachtung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung signifikant (s. Text).

Tab. 28: Berechnung der katabolischen Vielseitigkeit von Bodenpilzen in Naturböden aus der relativen Verteilung [%] aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) (*LSD*; p = 0,05; n = 10 Platten, 3 Versuche). Unterschiede zwischen den Naturböden waren nicht signifikant.

	Bedeutungswerte [%]*								
	Wald ub**				**Halde b****				
Substrat \ Versuch-Nr.	1	2	3	MW	1	2	3	MW	+/-***
Hippurat	10,33±0,88	14,07±2,23	14,65±1,76	13,02 ±2,34	13,36±5,72	12,09±5,20	13,99±2,29	13,15 ±0,97	
Phenylalanin	10,05±0,88	13,29±1,97	12,93±3,42	12,09 ±1,77	13,96±4,70	11,83±5,07	14,23±3,44	13,34 ±1,32	
4-Hydroxybenzoat	11,61±0,25	13,11±0,54	7,93±0,54	10,88 ±2,67	19,35±5,24	13,26±3,67	14,43±2,14	15,68 ±3,23	
4-Hydroxycinnamat	9,91±1,61	11,46±1,38	9,74±1,76	10,37 ±0,95	5,98±3,76	5,98±2,05	12,40±3,11	8,12 ±3,70	
Phenylacetat	7,93±3,46	10,51±1,57	11,03±1,08	9,82 ±1,66	5,78±2,73	5,46±1,71	13,99±1,45	8,41 ±4,84	
3-Hydroxybenzoat	8,92±0,85	8,94±1,69	11,29±1,04	9,72 ±1,36	21,94±5,24	12,09±5,02	16,03±2,53	16,69 ±4,96	(+)
2-Hydroxybenzoat	6,37±3,48	8,77±0,80	8,79±1,95	7,98 ±1,39	5,94±1,76	3,48±1,47	2,12±0,72	3,85 ±1,94	(-)
2-Aminobenzoat	4,95±2,83	4,95±0,78	8,01±1,57	5,97 ±1,77	2,47±0,48	1,20±0,24	1,47±0,32	1,71 ±0,67	(-)
2,4-Dihydroxybenzoat	8,21±0,65	5,38±0,60	3,62±0,68	5,74 ±2,32	2,39±2,63	8,84±2,93	6,38±2,64	5,87 ±3,25	
Veratrat	7,22±1,12	4,69±0,69	5,08±2,09	5,66 ±1,36	0,80±1,39	4,29±3,07	1,44±1,19	2,17 ±1,86	(-)
Benzoat	4,19±0,10	1,32±0,26	2,62±0,26	2,71 ±1,44	3,79±0,66	3,69±0,74	0,30±0,13	2,59 ±1,99	
Gentisat	4,10±0,55	1,04±0,14	0,88±0,29	2,01 ±1,82	1,91±0,70	5,64±1,08	2,35±0,20	3,30 ±2,04	
4-Aminobenzoat	2,04±0,74	0,30±0,11	1,43±0,13	1,25 ±0,88	1,74±0,71	1,46±0,34	0,76±0,12	1,32 ±0,50	
Cinnamat	2,26±2,49	0,78±0,69	0,26±0,00	1,10 ±1,04	0,48±0,08	0,25±0,07	0,09±0,02	0,28 ±0,20	
Mandelat	0,28±0,49	0,87±0,54	1,21±0,30	0,79 ±0,47	0,00	10,40±6,07	0,00	3,47 ±6,01	
Anisat	1,19±0,22	0,47±0,14	0,00	0,55 ±0,60	0,08±0,03	0,02±0,01	0,02±0,01	0,04 ±0,03	
4-Methoxycinnamat	0,44±0,43	0,05±0,05	0,54±0,22	0,34 ±0,26	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	-
Phthalat	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	
Terephthalat	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	
2,6-Dihydroxybenzoat	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	
Nicotinat	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00	
Summe aller *CFU* ($\times 10^3$)	2355	3839	3868		501	769	2508		
evenness	0,8548	0,7898	0,8032	**$0{,}82_a$ ±0,03**	0,7281	0,8133	0,7194	**$0{,}75_a$ ±0,05**	
Durchschnittswert (DW)	4,76	4,76	4,76		4,76	4,76	4,76		
Mittlere Abweichung (MA)	3,61	4,54	4,44	4,19 ±0,51	5,05	4,07	5,54	4,88 ±0,75	
Katabolische Vielseitigkeit	1,32	1,05	1,07	**$1{,}15_a$ ±0,15**	0,94	1,17	0,86	**$0{,}99_a$ ±0,16**	

*Bedeutungswerte = aromatenspezifische *CFU*/Summe aller *CFU*.
**ub = unbelastet, b = belastet.
***+/-: Veränderung infolge Schwermetallstress nur bei Betrachtung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung signifikant (s. Text).

Gemessen an den beiden Indices “*evenness*“ und “katabolische Vielseitigkeit“ und ihrer jeweiligen Standardabweichung, scheint Schwermetallstress keinen Einfluss auf die Verteilung von Abbaufähigkeiten in den beiden Bodenpaaren auszuüben. Dagegen ließen sich Unterschiede zwischen den Bodenpaaren erkennen: sowohl die *evenness* als auch die katabolische Vielseitigkeit war bei den Gemeinschaften aus Ackerböden signifikant höher als aus Naturböden. Diese Aussage wird durch eine Clusteranalyse der in den Tabellen 27 und 28 dargestellten relativen Nutzungshäufigkeiten unterstützt. Die Abbildung 18 zeigt ein Dendrogramm, in dem die beiden Bodenpaare auf einer hohen Distanzstufe voneinander getrennt sind. Die relativ große Ähnlichkeit zwischen den Belastungsstufen jedes Bodenpaars, erkennbar an der Tatsache, dass die drei zu einem Boden durchgeführten Versuche keine deutlich getrennten Tripletts bildeten, bestätigt die jeweils geringe Schwermetallwirkung.

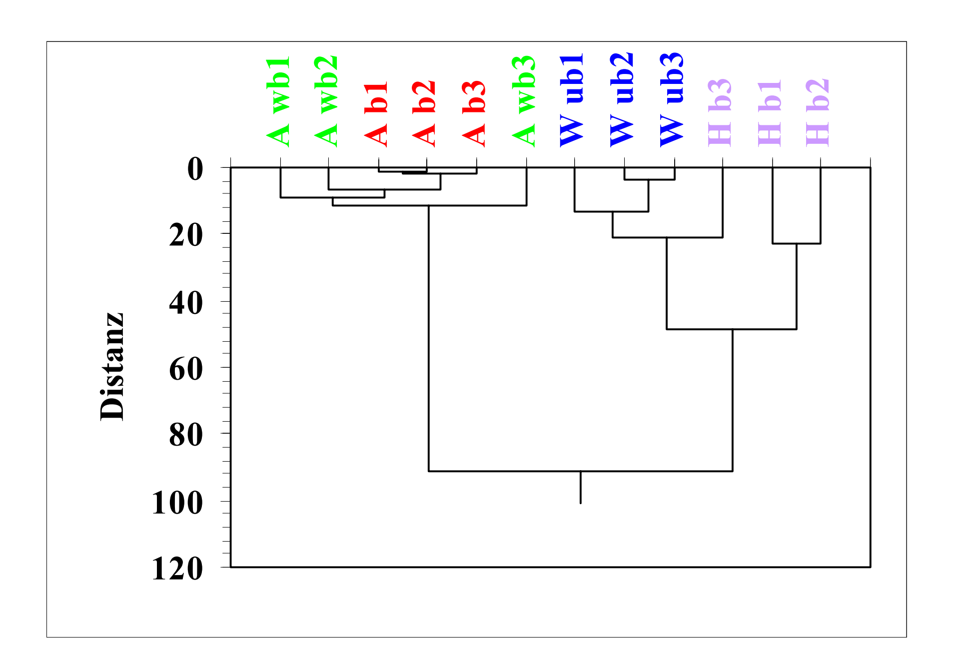


Abb. 18: Ähnlichkeit in der katabolischen Vielseitigkeit zwischen den Acker- und Naturböden, basierend auf der relativen Verteilung [%] aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*; s. Tabellen 27 u. 28). Distanz 0 = totale Ähnlichkeit. Beide Bodenpaare sind auf einer hohen Distanzstufe getrennt. Bodenpaar I: Ackerböden (A), wb = wenig belastet, b = belastet. Bodenpaar II: Wald- (W) und Haldenboden (H), ub = unbelastet, b = belastet.

3.2.2.2 Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit schwermetallgestresster Pilzgemeinschaften im Boden durch respirometrische Bestimmung aromatenspezifischer Abbauzeiten

Schwermetallwirkungen auf Gemeinschaften von Bodenmikroorganismen lassen sich auch messen, indem man den Abbau der aromatischen Testsubstrate *in situ*, d.h. direkt im Boden, verfolgt. Wenn diese dem Boden in äquienergetischen Mengen zugesetzt werden, müssen sich aufgrund ihrer voneinander abweichenden Qualität als C- und Energiequellen unterschiedliche Abbauzeiten einstellen (Kap. 2.2.2.2.2). Unter Schwermetallstress müssten sich die Abbauzeiten gerade wegen dieser ungleichen Substratqualität unterschiedlich verlängern, so dass ihre Verteilung weniger gleichmäßig ausfällt. Weiter wurde vermutet, dass sich aus der Verteilung aromatenspezifischer Abbauzeiten, wie aus der Verteilung aromatenspezifischer *CFU*, Indices für die Verteilung von Abbaufähigkeiten im Boden (*evenness*, katabolische Vielseitigkeit) errechnen lassen. Da bei diesen Messungen, im Gegensatz zur Bestimmung substratspezifischer *CFU*, die Schwermetalle wirksam bleiben, kann davon ausgegangen werden, dass zwischen belasteten und unbelasteten Böden Unterschiede sichtbar werden. Obwohl in Böden neben Pilzen auch Bakterien aktiv sind, kann aus der Tatsache, dass der Pilzanteil an der Bodenatmung mindestens 70 % beträgt (Anderson und Domsch, 1975) geschlossen werden, dass auch bei diesen Versuchen weitgehend Pilze erfasst werden.

In den Tabellen 29 und 30 wurden die Ergebnisse als reziproke Werte der Abbauzeiten dargestellt. Der Grund hierfür ist, dass Abbauzeiten > 150 h nicht messbar waren und als unendlich hätten gewertet werden müssen, so dass die Berechnung der Indices nicht möglich gewesen wäre. Der Einsatz von Kehrwerten erlaubte es dagegen, solche Abbauzeiten mit dem Wert Null zu belegen. Er hatte auch den Vorteil, dass zunehmender Schwermetallstress durch kleiner werdende Zahlen wiedergegeben wurde. Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, konnte in beiden Ackerböden 4-Aminobenzoat nicht genutzt werden. Darüber hinaus konnte im wenig belasteten Ackerboden Gentisat und im belasteten Ackerboden Anisat nicht veratmet werden. Von den Naturböden konnte ebenfalls das Substrat Gentisat nicht genutzt werden. Im belasteten Haldenboden konnte für die aromatischen Säuren Terephthalat, 2,6-Dihydroxybenzoat, Veratrat und p-Toluat keine Nutzung festgestellt werden.

Tab. 29: Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit von Ackerböden durch Verrechnung der reziproken Abbauzeiten (Atmungsmaxima) aromatischer Säuren* (*LSD*; p = 0,05; n = 3). Die Unterschiede zwischen den Ackerböden waren signifikant.

	Acker wb**					**Acker b****					
Substrat* \ Versuch-Nr.	1	2	3	MW		1	2	3	MW		+/-***
4-Hydroxycinnamat	0,06061	0,05556	0,05882	0,05833	±0,00256	0,06897	0,07143	0,07692	0,07244	±0,00407	+
3-Hydroxybenzoat	0,05128	0,04762	0,04762	0,04884	±0,00211	0,08000	0,08333	0,07692	0,08009	±0,00321	+
Cinnamat	0,04651	0,04545	0,04545	0,04581	±0,00061	0,04444	0,04167	0,04167	0,04259	±0,00160	-
Anisat	0,05128	0,04167	0,04167	0,04487	±0,00555	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	-
2-Hydroxybenzoat	0,04255	0,04000	0,05000	0,04418	±0,00520	0,06452	0,05263	0,05000	0,05572	±0,00773	
Hippurat	0,04255	0,04000	0,04348	0,04201	±0,00180	0,06061	0,05882	0,06250	0,06064	±0,00184	+
Phenylacetat	0,03636	0,03571	0,03571	0,03593	±0,00037	0,04255	0,03846	0,04000	0,04034	±0,00207	+
Mandelat	0,03636	0,03333	0,03704	0,03558	±0,00197	0,03509	0,03226	0,03333	0,03356	±0,00143	
Phthalat	0,03774	0,03448	0,03125	0,03449	±0,00324	0,03636	0,03226	0,03333	0,03399	±0,00213	
Veratrat	0,03509	0,03226	0,03448	0,03394	±0,00149	0,05714	0,04762	0,05000	0,05159	±0,00496	+
Terephthalat	0,03509	0,03333	0,03125	0,03322	±0,00192	0,02985	0,02778	0,02857	0,02873	±0,00105	-
2,6-Dihydroxybenzoat	0,03175	0,02857	0,02778	0,02937	±0,00210	0,03922	0,03571	0,03704	0,03732	±0,00177	+
Nicotinat	0,02667	0,02632	0,02703	0,02667	±0,00036	0,05128	0,04545	0,04762	0,04812	±0,00295	+
2,4-Dihydroxybenzoat	0,02667	0,02381	0,02564	0,02537	±0,00145	0,01325	0,01266	0,01639	0,01410	±0,00201	-
4-Hydroxybenzoat	0,02597	0,02439	0,02439	0,02492	±0,00091	0,01681	0,01613	0,01613	0,01635	±0,00039	-
Phenylalanin	0,02532	0,02381	0,02439	0,02451	±0,00076	0,01835	0,01818	0,01818	0,01824	±0,00010	-
p-Toluat	0,02469	0,02381	0,02326	0,02392	±0,00072	0,01905	0,01923	0,01852	0,01893	±0,00037	-
2-Aminobenzoat	0,01869	0,01852	0,01786	0,01836	±0,00044	0,10526	0,11111	0,07692	0,09777	±0,01829	+
Benzoat	0,01626	0,01471	0,01449	0,01515	±0,00096	0,00922	0,00654	0,00769	0,00781	±0,00134	-
4-Aminobenzoat	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	
Gentisat	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	0,13333	0,14286	0,12500	0,13373	±0,00894	+
evenness	0,94987	0,95099	0,94844	**$0,95_b$**	**±0,001**	0,90287	0,89126	0,90743	**$0,90_a$**	**±0,008**	
Durchschnittswert (DW)	0,03197	0,02968	0,03055	0,03074	±0,00116	0,04406	0,04258	0,04080	0,04248	±0,00163	
Mittlere Abweichung (MA)	0,01755	0,01725	0,01792	0,01757	±0,00033	0,02769	0,02904	0,02672	0,02782	±0,00116	
Katabolische Vielseitigkeit	1,82198	1,72080	1,70537	**$1,75_b$**	**±0,06**	1,59137	1,46618	1,52678	**$1,53_a$**	**±0,06**	

*Applikation in äquienergetischen Mengen (Bezugsgröße: 1,5 mmol 4HB kg^{-1}).
**wb = wenig belastet, b = belastet.
***+/-: Signifikante Veränderung infolge Schwermetallstress.

Tab. 30: Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit von Naturböden durch Verrechnung der reziproken Abbauzeiten (Atmungsmaxima) aromatischer Säuren* (*LSD*; p = 0,05; n = 3). Die Unterschiede zwischen dem Waldboden und dem Haldenboden waren signifikant.

	Wald ub**					**Halde b****					
Substrat* \ Versuch-Nr.	1	2	3	MW		1	2	3	MW		+/-***
3-Hydroxybenzoat	0,06250	0,06250	0,06349	0,06283	±0,00057	0,08000	0,08000	0,07547	0,07849	±0,00261	+
Hippurat	0,06250	0,05882	0,06349	0,06161	±0,00246	0,09524	0,07407	0,08163	0,08365	±0,01073	+
4-Hydroxycinnamat	0,05263	0,05000	0,05634	0,05299	±0,00318	0,11765	0,08696	0,05195	0,08552	±0,03287	
4-Hydroxybenzoat	0,05556	0,05000	0,05333	0,05296	±0,00280	0,08000	0,06452	0,05797	0,06750	±0,01131	+
Cinnamat	0,05263	0,05000	0,04819	0,05027	±0,00223	0,18182	0,07407	0,08163	0,11251	±0,06014	
Benzoat	0,04762	0,04762	0,05063	0,04862	±0,00174	0,08000	0,07407	0,07018	0,07475	±0,00495	+
Phenylalanin	0,05263	0,04348	0,04396	0,04669	±0,00515	0,03922	0,03774	0,04938	0,04211	±0,00634	
2-Hydroxybenzoat	0,04167	0,04000	0,04040	0,04069	±0,00087	0,05405	0,05128	0,04938	0,05157	±0,00235	+
Phenylacetat	0,03704	0,03846	0,03883	0,03811	±0,00095	0,03390	0,02899	0,02920	0,03069	±0,00278	-
Mandelat	0,03571	0,03571	0,03361	0,03501	±0,00121	0,03077	0,02817	0,03008	0,02967	±0,00135	-
2-Aminobenzoat	0,03125	0,03030	0,02797	0,02984	±0,00169	0,02899	0,02667	0,02484	0,02683	±0,00208	
2,4-Dihydroxybenzoat	0,02564	0,02381	0,02878	0,02608	±0,00251	0,02899	0,02817	0,02367	0,02694	±0,00286	
Terephthalat	0,02564	0,02632	0,02454	0,02550	±0,00090	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	-
Anisat	0,02041	0,01923	0,01896	0,01953	±0,00077	0,01626	0,01481	0,01365	0,01491	±0,00131	-
2,6-Dihydroxybenzoat	0,01923	0,01852	0,01860	0,01878	±0,00039	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	-
Veratrat	0,01587	0,01587	0,01702	0,01626	±0,00066	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	-
4-Aminobenzoat	0,01639	0,01449	0,01544	0,01544	±0,00095	0,01709	0,01460	0,01509	0,01560	±0,00132	
Nicotinat	0,01064	0,01000	0,00911	0,00992	±0,00077	0,02817	0,02469	0,02162	0,02483	±0,00328	+
Phthalat	0,00870	0,00787	0,00789	0,00815	±0,00047	0,01290	0,01170	0,01347	0,01269	±0,00091	+
p-Toluat	0,00826	0,00813	0,00802	0,00814	±0,00012	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	-
Gentisat	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	±0,00000	
evenness	0,93544	0,93588	0,93316	$\mathbf{0,93_b}$	**±0,001**	0,82549	0,85584	0,85859	$\mathbf{0,85_a}$	**±0,02**	
Durchschnittswert (DW)	0,03250	0,03101	0,03184	0,03178	±0,00075	0,04405	0,03431	0,03282	0,03706	±0,00610	
Mittlere Abweichung (MA)	0,02449	0,02436	0,02477	0,02454	±0,00021	0,03917	0,03546	0,03524	0,03662	±0,00221	
Katabolische Vielseitigkeit	1,32735	1,27303	1,28540	$\mathbf{1,30_b}$	**±0,03**	1,12470	0,96767	0,93128	$\mathbf{1,01_a}$	**±0,10**	

*Applikation in äquienergetischen Mengen (Bezugsgröße: 1,5 mmol 4HB kg^{-1}).
**ub = unbelastet, b = belastet.
***+/-: Signifikante Veränderung infolge Schwermetallstress.

Die aus der Verteilung aromatenspezifischer Abbauzeiten errechneten Indices “*evenness*“ und “katabolische Vielseitigkeit“ zeigen nicht nur zwischen den beiden Bodenpaaren gesicherte Unterschiede an, sondern auch jeweils zwischen den Acker- und den Naturböden. Diesen eindeutigen Schwermetalleffekt lässt auch das in der Abbildung 19 gezeigte Dendrogramm erkennen. Deutlich ist die Anordnung aller drei Versuche eines Bodens als Triplett zu sehen sowie die deutliche Abgrenzung zwischen den Böden. Die größte Streuung trat innerhalb des Haldenbodens auf.

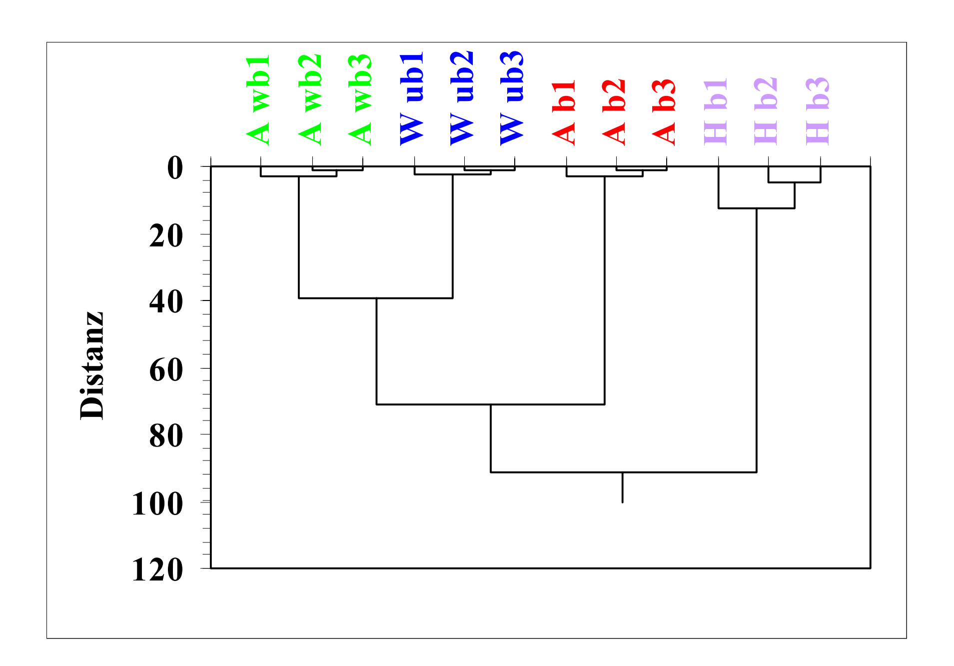


Abb. 19: Ähnlichkeit in der katabolischen Vielseitigkeit zwischen den Acker- und Naturböden, basierend auf der Verteilung von reziproken Abbauzeiten (Atmungsmaxima) aromatischer Säuren. Distanz 0 = totale Ähnlichkeit. Alle drei Versuche eines Bodens clustern auf einer geringen Distanzstufe als Triplett. Bodenpaar I: Ackerböden (A), wb = wenig belastet, b = belastet. Bodenpaar II: Wald- (W) und Haldenboden (H), ub = unbelastet, b = belastet.

3.3 Wirkung von Schwermetallen auf Bodenpilze auf der Artebene

Ein Nebenziel der kombinierten Bild- und Clusteranalyse war es, Isolate gleicher Pilzarten aus belastetem und unbelastetem Boden ohne mehrmaligen Zugriff auf die Stammsammlung zu finden. Grund für diese Maßnahme war die Gefahr der Kontamination und genetischen Veränderung (Segregation von Kernen) der Isolate. Sie wurde durch das gemeinsame Clustern von Isolaten aus jeweils einem Bodenpaar unterstützt. Es zeigte sich, dass nur zwei Bildtypen in ausreichender Zahl in beiden Varianten eines Bodenpaars vorkamen. Einer

dieser Bildtypen aus den beiden Naturböden war monoverticillat und konnte der Art *Penicillium fellutanum* (Domsch et al., 1993; Raper und Thom, 1949) zugeordnet werden. Der andere Bildtyp aus den beiden Ackerböden war divaricat und entsprach der Art *Penicillium nigricans*. Ein weiterer monoverticillater Bildtyp wurde nur aus Waldboden isoliert und als *Penicillium frequentans* identifiziert. Diese drei Arten wurden physiologisch hinsichtlich ihres Wachstums, ihrer katabolischen Fähigkeiten sowie ihres Verhaltens gegenüber Schwermetallen untersucht.

3.3.1 Einfluss der Bodenbelastung mit Schwermetallen auf die Wuchsleistung von Isolaten dreier Arten der Gattung *Penicillium*

Die Ergebnisse der Wachstumsanalyse sind in der Tabelle 31 zusammengestellt und entsprechen den Bildanalysedaten, die auch bei der Eingruppierung der Bildtypen (Kap. 3.2.1.2) Verwendung fanden. Sie zeigen, dass die Bodenbelastung mit Schwermetallen weder bei *P. nigricans* noch bei *P. fellutanum* zu signifikanten Veränderungen hinsichtlich ihrer Wuchsleistung auf unkontaminiertem Nährboden (Tab. 5) führte. Insgesamt sind die drei untersuchten Arten mit einer durchschnittlichen Wuchsleistung von etwa 1,4 mm d^{-1} in eine Gruppe mittlerer Wachstumsgeschwindigkeit einzuordnen.

Tab. 31: Lineares Wachstum von Isolaten der Gattung *Penicillium*. Die drei gezeigten Pilzarten weisen ein ähnliches durchschnittliches lineares Wachstum auf.

Pilzart	Herkunft	Isolatzahl	lineares Wachstum		
			DW**	MA+	VK++
P. nigricans	Acker wb*	20	1,315	0,150	0,114
	Acker b*	20	1,374	0,111	0,081
P. fellutanum	Wald ub*	20	1,376	0,077	0,056
	Halde b*	20	1,429	0,104	0,073
P. frequentans	Wald ub*	57	1,407	0,065	0,046

*wb = wenig belastet, ub = unbelastet, b = belastet.
**DW = Durchschnittswert, [mm d^{-1}].
+MA = Mittlere Abweichung.
++VK = Variationskoeffizient (MA/DW).

3.3.2 Einfluss der Bodenbelastung mit Schwermetallen auf die katabolische Vielseitigkeit von Isolaten dreier Arten der Gattung *Penicillium*

Wie in Material und Methoden dargelegt (Kap. 2.1.3.1 u. 2.1.3.2), wurden für diese Untersuchungen aromatische Säuren, Polymere und hydrophobe Substanzen als Testsubstrate verwendet. Die Bereitung der Medien wurde an gleicher Stelle beschrieben. Von den drei untersuchten Arten wurde *Penicillium nigricans* aus den Ackerböden, *P. fellutanum* aus den Naturböden und *P. frequentans* nur aus dem Waldboden isoliert.

Die Nutzung aromatischer Säuren durch die drei Arten ist in der Tabelle 32 zusammengestellt. Es wird deutlich, dass von den angebotenen Verbindungen etwa eine Hälfte von allen Isolaten der drei Arten, ein anderer Teil dagegen von keinem Isolat genutzt wurde. Dadurch sind die Möglichkeiten einer Differenzierung der Arten aufgrund ihrer katabolischen Fähigkeiten erheblich eingeschränkt. *Penicillium nigricans*, das optisch gut zu erkennen ist, war physiologisch lediglich durch seine Fähigkeit zur Nutzung von Anisat von den beiden anderen Arten zu unterscheiden. *Penicillium frequentans* ist aufgrund seiner Nutzung von Veratrat, 4-Aminobenzoat und Nicotinat zwar von den beiden anderen Arten unterscheidbar. Da die aromatischen Säuren aber nicht von allen Isolaten genutzt wurden, ist eine Einordnung einzelner Isolate aufgrund dieser katabolischen Fähigkeiten nicht möglich. Eventuell lassen sich die drei Arten aber hinsichtlich ihrer durchschnittlichen katabolischen Leistungsfähigkeit bzw. Vielseitigkeit unterscheiden. Zwar konnten die Experimente aus Mangel an Material nur einmal durchgeführt werden, so dass eine statistische Sicherung nicht möglich ist. Jedoch nehmen beide Indices in der Reihenfolge *P. nigricans* > *P. frequentans* > *P. fellutanum* ab. Dies gilt auch für die *evenness*, die, wie die katabolische Vielseitigkeit, ein Index für die Verteilung von Fähigkeiten in Populationen oder Gemeinschaften ist. Dagegen ist eine Wirkung von Schwermetallen auf die katabolischen Fähigkeiten der beiden Arten *P. nigricans* und *P. fellutanum* praktisch nicht nachweisbar, da die beobachteten Unterschiede zu gering waren.

Tab. 32: Häufigkeit der Nutzung von 21 aromatischen Säuren als einzige C-Quelle durch Isolate von drei Arten der Gattung *Penicillium* aus unterschiedlich schwermetallbelasteten Böden. Schwermetalle hatten keinen Einfluss auf die katabolischen Fähigkeiten zur Nutzung von aromatischen Säuren bei den Arten *P. nigricans* und *P. fellutanum*. Die Substratnutzungsspektren befinden sich im Anhang unter 7.4.

	Zahl getesteter Isolate				
	20	20	20	20	57
	Nutzungshäufigkeit				
	P. nigricans		*P. fellutanum*		*P. frequentans*
Substrate**	Acker wb*	Acker b*	Wald ub*	Halde b*	Wald ub*
Hippurat	20	20	20	20	57
4-Hydroxycinnamat	20	20	20	20	57
Phenylalanin	20	20	20	20	57
Benzoat	20	20	20	20	57
Cinnamat	20	20	20	20	57
2-Aminobenzoat	20	20	20	20	57
4-Hydroxybenzoat	20	20	19	20	57
2-Hydroxybenzoat	20	20	19	19	56
3-Hydroxybenzoat	20	20	18	20	57
2,4-Dihydroxybenzoat	20	20	0	2	16
Anisat	20	20	0	2	0
4-Methoxycinnamat (Hofbildung)	20 (20)	20 (20)	0 (9)	2 (13)	2 (13)
Phenylacetat	19	20	20	20	56
Veratrat	4	1	0	1	14
Mandelat	0	0	0	0	0
4-Aminobenzoat	0	0	0	0	38
Gentisat	0	0	0	0	0
2,6-Dihydroxybenzoat	0	0	0	0	0
Phthalat	0	0	0	0	0
Terephthalat	0	0	0	0	0
Nicotinat	0	0	0	0	41
Summe der Häufigkeiten	263	261	196	206	679
Leistungsfähigkeit+	0,63	0,62	0,47	0,49	0,57
Durchschnittswert (DW)	12,52	12,43	9,33	9,81	32,33
Mittlere Abweichung (MA)	9,16	9,37	9,78	9,61	24,67
Vielseitigkeit	1,37	1,33	0,95	1,02	1,31
evenness	0,8555	0,8475	0,7561	0,7944	0,8513

*wb = wenig belastet, ub = unbelastet, b = belastet.
**Konzentration: 10 mM.
+Nutzung/Angebot = Summe der tatsächlichen Häufigkeiten/Summe der maximal möglichen Häufigkeiten.

Die Untersuchungen zur Nutzung von Polymeren und hydrophoben Substanzen führten im Prinzip zu keinem anderen Ergebnis (Tab. 33). *P. fellutanum* scheint sich von den beiden anderen Arten durch die Nutzung von Paraffin bzw. die Nichtnutzung von Rhamsan und Gellan zu unterscheiden, während sich *P. frequentans* durch etwas höhere Indices von den

beiden anderen Arten abhebt. Hinsichtlich des Abbaus von Polymeren führten Schwermetalle bei *P. nigricans* zu einer geringfügigen Erhöhung der Indices, hatten aber bei *P. fellutanum* eine uneinheitliche Wirkung. Da die Reaktionen von *P. nigricans* und *P. fellutanum* bezüglich der Nutzung von Polymeren und Aromaten gegensätzlich verliefen, kann eine Schwermetallwirkung auf die Fähigkeit zum Abbau beider Substanzklassen praktisch ausgeschlossen werden. Die Daten zu den Substratnutzungsspektren der einzelnen Isolate befinden sich im Anhang unter 7.4.

Tab. 33: Häufigkeit der Nutzung von 15 Polymeren und hydrophoben Substanzen durch Isolate von drei Arten der Gattung *Penicillium* aus unterschiedlich schwermetallbelasteten Böden. Schwermetalle hatten keinen gesicherten Einfluss auf die katabolischen Fähigkeiten zur Nutzung von Polymeren/hydrophoben Substanzen bei den Arten *P. nigricans* und *P. fellutanum*. Die Substratnutzungsspektren befinden sich im Anhang unter 7.4.

	Zahl getesteter Isolate				
	20	20	20	20	57
	Nutzungshäufigkeit				
	P. nigricans		*P. fellutanum*		*P. frequentans*
Substrate**	Acker wb*	Acker b*	Wald ub*	Halde b*	Wald ub*
Xylan	20	20	20	20	57
Lecithin	20	20	20	20	57
Keratin	20	20	20	20	57
Tannin (Hofbildung)	20 (20)	20 (20)	19 (20)	15 (18)	57 (57)
Chitin	19	20	18	11	55
Cellulose; Avicel	19	19	20	20	56
Ligninsulfonsäure; Ca-Salz	12	9	16	15	52
Rhamsan	6	9	0	0	41
Gellan	2	6	0	0	23
Paraffin	0	0	20	19	0
Carragenin	0	0	0	0	2
Xanthan	0	4	0	0	12
Dextran	0	0	0	0	0
Manutex RH	0	0	0	0	0
Celluloseacetat	0	0	0	0	0
Summe der Häufigkeiten	138	147	153	140	469
Leistungsfähigkeit+	0,46	0,49	0,51	0,47	0,55
Durchschnittswert (DW)	9,20	9,80	10,20	9,33	31,27
Mittlere Abweichung (MA)	8,75	8,03	9,52	8,71	24,25
Vielseitigkeit	1,05	1,22	1,07	1,07	1,29
evenness	0,7665	0,8095	0,7669	0,7612	0,8314

*wb = wenig belastet, ub = unbelastet, b = belastet.
**Medien: Substrate liegen in disperser Form vor.
+Nutzung/Angebot = Summe der tatsächlichen Häufigkeiten/Summe der maximal möglichen Häufigkeiten.

3.3.3 Einfluss von Schwermetallen auf lineares Wachstum und relative Biomasse bei *Penicillium fellutanum* und *Penicillium nigricans*

Zur Ermittlung des Einflusses von Schwermetallen auf das lineare Wachstum von Penicillien wurden etwa 40 Isolate von *P. fellutanum* aus unbelastetem Waldboden und belastetem Haldenboden auf Nährböden zunehmender Schwermetallkontamination ($CuSO_4$ u. $ZnSO_4$) geimpft. Der tägliche Zuwachs [mm d^{-1}] wurde bildanalytisch bestimmt. Wie die Tabelle 34 zeigt, wurden neben der Kontrolle (0) für Kupfer die Konzentrationen 4 mM und 8 mM und für das weniger toxische Zink die Konzentrationen 7 mM und 15 mM getestet. Ohne Schwermetallkontamination des Mediums wuchsen die Isolate aus Waldboden (n = 40) im Durchschnitt etwas schneller (3,83 ± 0,45 mm d^{-1}) als die aus Haldenboden (n = 41) (3,56 ± 0,19 mm d^{-1}). Auch die mittlere Abweichung von der durchschnittlichen Wachstumsrate der Pilze war im Waldboden (0,45/3,83 = 0,117) größer als im Haldenboden (0,19/3,56 = 0,053). Aufgrund des schon in Kapitel 3.2.1.1 Gesagten (Tab. 25, Abb. 16 u. 17) lässt eine hohe Variabilität des Wachstums auf eine hohe Diversität schließen. Demnach muss *P. fellutanum* im unkontaminierten Waldboden eine größere innerartliche Diversität aufweisen als im kontaminierten Haldenboden. Eine höhere Variabilität der Isolate aus Waldboden war auch noch zu erkennen, wenn die Testmedien mit 4 mM und 8 mM Cu^{2+} bzw. 7 mM Zn^{2+} kontaminiert waren. Mit zunehmender Schwermetallbelastung zeigten die Pilze aus Waldboden einen relativ steileren Abfall in der Wuchsleistung als die Pilze aus Haldenboden, ein Zeichen für ihre höhere Sensitivität gegenüber den beiden Schwermetallen. Da sich Kupfer und Zink in diesem Versuch nur durch ihre konzentrationsabhängige Toxizität unterschieden, wurde in den folgenden Versuchen ausschließlich Kupfer verwendet, auch wenn die vier Testböden nur gering mit diesem Schwermetall belastet waren (Tab. 4).

Tab. 34: Einfluss von Kupfer und Zink auf das lineare Wachstum von Isolaten der Art *P. fellutanum* aus mit Schwermetallen (SM) belastetem Haldenboden (n = 41) und unbelastetem Waldboden (n = 40). Isolate aus Waldboden reagierten auf die zunehmende Belastung mit Schwermetallen empfindlicher als Isolate aus Haldenboden.

SM im Nährboden	$[mm\ d^{-1}]$			
	Wald ub*			
Cu^{2+} [mM]		0	4	8
	DW**	3,83	0,32	0,14
	MA+	0,45	0,27	0,12
Zn^{2+} [mM]		0	7	15
	DW**	3,83	1,28	0,81
	MA+	0,45	0,31	0,11
	Halde b*			
Cu^{2+} [mM]		0	4	8
	DW**	3,56	1,69	0,69
	MA+	0,19	0,75	0,38
Zn^{2+} [mM]		0	7	15
	DW**	3,56	1,53	0,87
	MA+	0,19	0,26	0,12

*ub = unbelastet, b = belastet.
**DW = Durchschnittswert.
+MA = mittlere Abweichung.

Zur Untersuchung des Einflusses von Schwermetallen auf die Biomassebildung einzelner Pilzarten wurde das in Kapitel 3.1.2 (Tab. 24) beschriebene Verfahren eingesetzt, mit dem die relative Biomasse als Produkt aus relativer Koloniefläche und relativer Koloniedichte (Extinktion) bildanalytisch abgeschätzt werden kann. Je 20 Isolate von *P. nigricans* aus wenig belastetem und belastetem Ackerboden wurden auf mit Kupfer kontaminierte Nährböden geimpft und diesbezüglich miteinander verglichen. Ein Vorversuch hatte gezeigt, dass neben der Kontrolle (nicht kontaminierter Nährboden) Kupferkonzentrationen von 0,5, 1 und 1,5 mM sinnvoll waren. Um zu zeigen, wie sich die beiden für die Bestimmung der relativen Biomasse verwendeten Parameter (Koloniefläche u. Koloniedichte) gegenüber Schwermetallstress verhalten, werden die entsprechenden Werte zusätzlich zur relativen Biomasse (ihrem Produkt) dargestellt. Da die einzelnen Werte immer auf die des unkontaminierten Nährbodens bezogen wurden, wurden für die Kontrollen in den Abbildungen 20 a-c und 21 a-c die Variationskoeffizienten angegeben. Bei den Isolaten aus wenig belastetem Ackerboden waren diese immer etwas größer als bei Isolaten aus belastetem Ackerboden. Hieraus kann, ähnlich wie

beim Wachstum (Tab. 34), bei den Isolaten aus wenig belastetem Ackerboden auf eine vergleichsweise etwas höhere innerartliche Diversität geschlossen werden als bei den Isolaten aus belastetem Ackerboden. Die Abbildungen 20 a und 20 b zeigen, dass sich Koloniefläche und Koloniedichte bei den Stämmen von *P. nigricans* aus Ackerböden hinsichtlich ihrer Abnahme infolge Kupferstress nicht nennenswert voneinander unterschieden, so dass auch ihr Produkt, die relative Biomasse, in gleichem Maße abnahm (Abb. 20 c). Da auch die Durchschnittswerte für die relative Biomasse bei den Stämmen aus Acker wb und Acker b mit zunehmender Kupferkontamination des Nährbodens mit gleicher Rate abnahmen, kann man davon ausgehen, dass sich trotz der stärkeren Belastung im Acker b noch keine Toleranz/Resistenz gegenüber Schwermetallen entwickelt hatte.

Anders scheinen die Verhältnisse in den Naturböden zu sein. Hier waren die Variationskoeffizienten für Koloniefläche und Koloniedichte der 20 Isolate von *P. fellutanum* aus Haldenboden auf dem unkontaminierten Nährboden größer als bei den Isolaten aus Waldboden. Im Gegensatz zu *P. nigricans* weist dies auf eine etwas höhere Diversität der Isolate aus belastetem Haldenboden gegenüber den Isolaten aus unbelastetem Waldboden hin. Der große Unterschied zu *P. nigricans* besteht vor allem darin, dass die Koloniedichte bei Kupferstress mit geringerer Rate abnahm als die Koloniefläche, wenn dieser Effekt bei den Isolaten aus Waldboden auch weniger ausgeprägt war als bei den Isolaten aus Haldenboden (Abb. 21 a u. b). Daraus ergibt sich für die relative Biomasse eine stärkere Abnahme bei den Waldisolaten und folglich eine geringere Toleranz/Resistenz als bei den Haldenisolaten (Abb. 21 c).

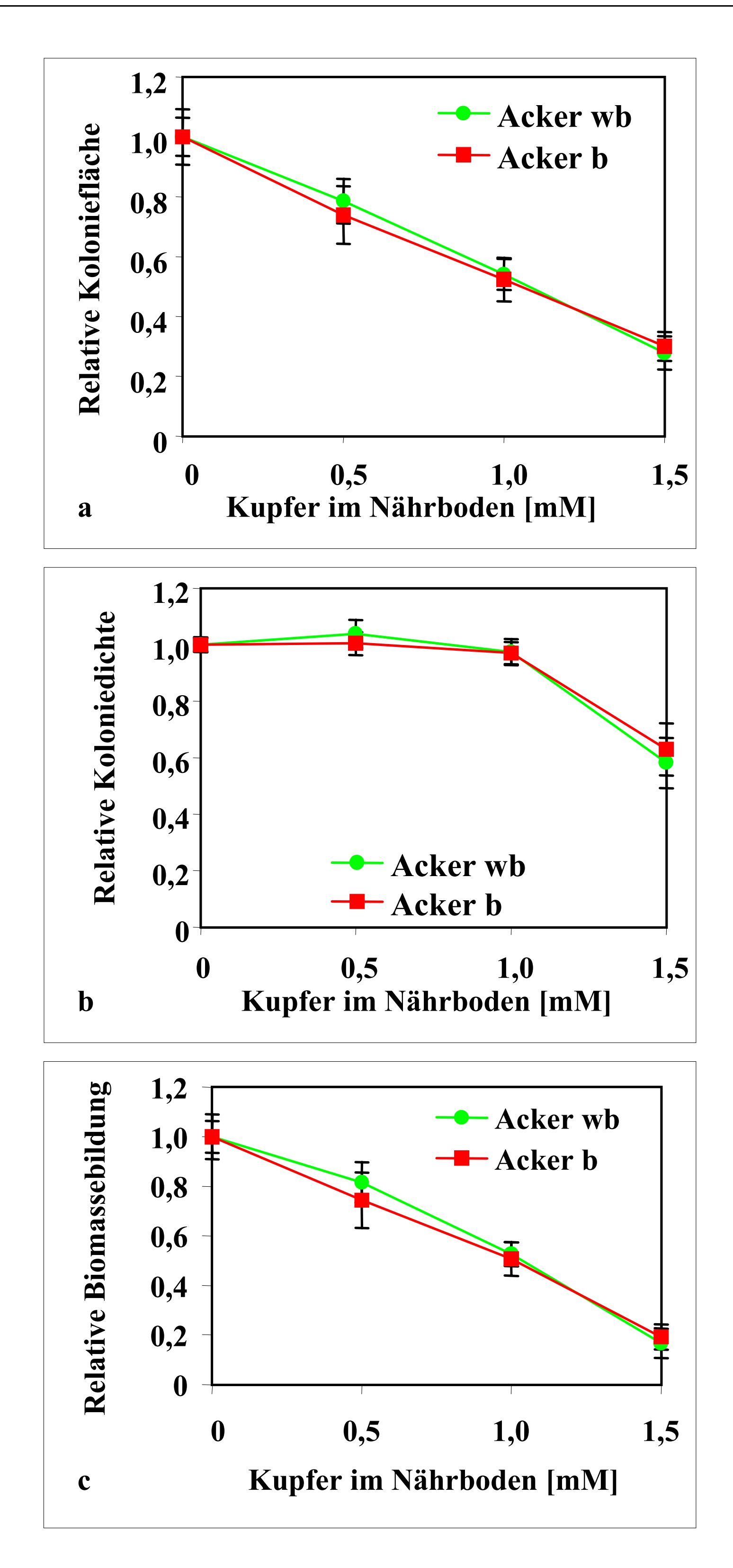


Abb. 20: Einfluss steigender Kupferkontamination des Nährbodens auf die relative Koloniefläche (a), die relative Koloniedichte (b) sowie das Produkt aus beiden Parametern, die relative Biomassebildung (c), bei jeweils 20 Isolaten von *P. nigricans* aus unterschiedlich schwermetallbelasteten Ackerböden (wb = wenig belastet, b = belastet). Signifikante Unterschiede zwischen Isolaten aus wenig belastetem und belastetem Ackerboden waren nicht zu erkennen.

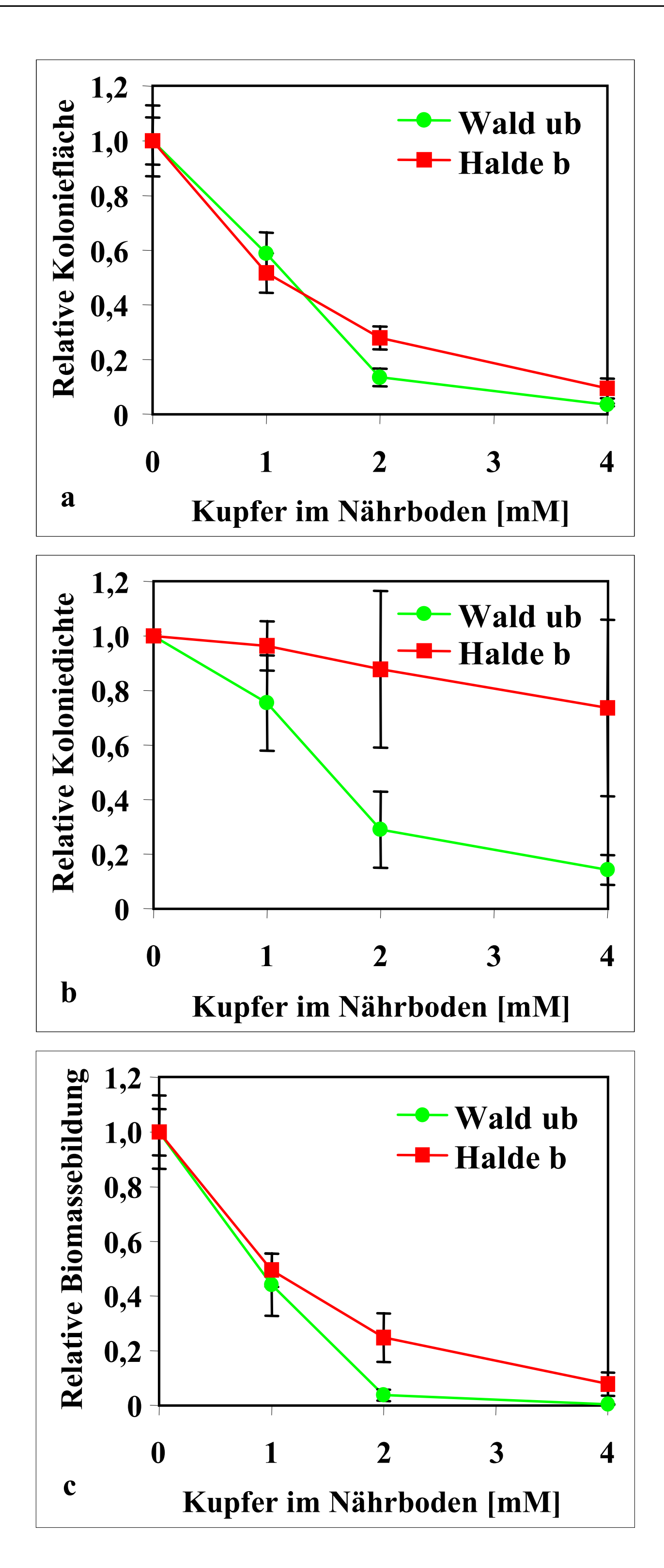


Abb. 21: Einfluss steigender Kupferkontamination des Nährbodens auf die relative Koloniefläche (a), die relative Koloniedichte (b) sowie das Produkt aus beiden Parametern, die relative Biomassebildung (c), bei jeweils 20 Isolaten von *P. fellutanum* aus Wald- und Haldenboden (ub = unbelastet, b = belastet). Nur bei einer Kontamination des Nährbodens mit 2 mM Kupfer waren signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten aus Wald- und Haldenboden zu erkennen.

3.3.4 Physiologisch-biochemische Unterschiede zwischen vier ausgewählten Isolaten von *Penicillium fellutanum* aus Wald- und Haldenboden

Wie die Abbildung 21 zeigt, waren die Unterschiede zwischen den Isolaten aus Wald- und Haldenboden nur bei einer Kontamination des Nährbodens von 2 mM Kupfer signifikant. Es war zu fragen, ob dies die einzige Möglichkeit der Unterscheidung zwischen kupfertoleranten/-resistenten und -sensitiven Isolaten von *P. fellutanum* darstellt oder ob die beiden Isolategruppen auch durch physiologische bzw. biochemische Charakteristika voneinander zu trennen sind. Bekanntlich besitzen Pilze Mechanismen, die Toleranz bzw. Resistenz vermitteln und die es ihnen gestatten, einem Schwermetallstress auszuweichen (Tomsett, 1993). Nach Gadd (1986 b; 1989) werden in der Pilztoxikologie die Begriffe Toleranz bzw. Resistenz gegenüber Schwermetallen häufig als Synonyme verwendet, weil sie angeblich noch nicht eindeutig definiert wurden. Dies gelte auch für die Synthese der ubiquitären Metallothioneine, die sowohl die Aufnahme als auch die Detoxifikation von Schwermetallen regulieren (Hamer, 1986; Mehra und Winge, 1991; Nielson et al., 1985). Da eine Definition der genannten Begriffe auch für die Interpretation der eigenen Ergebnisse von Nutzen sein könnte, wurden aus den 40 getesteten Isolaten von *P. fellutanum* aus Wald- und Haldenboden (Abb. 21) jeweils zwei ausgewählt, die gegenüber Kupfer offensichtlich besonders sensitiv bzw. tolerant/resistent waren. Neben der Biomassebildung wurde der Gehalt an Protein sowie die Bildung von Sulfhydryl (SH)-Gruppen quantifiziert (Kap. 2.2.3.2.2), deren Mehrsynthese als Bildung von Metallothioneinen verstanden wurde.

Die Auswahl der geeigneten Kontaminationsstufen für das Flüssigmedium wurde u.a. davon abhängig gemacht, dass auch der schwermetallsensitivste Pilz nach einer bestimmten Inkubationszeit ausreichend Biomasse für den Zellaufschluss und die anschließende Quantifizierung von Protein und SH-Gruppen bilden konnte. Die Abbildung 22 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von Feuchtbiomasse für die Konzentrationen 1 mM und 1,5 mM Kupfer bei dem offensichtlich kupfersensitivsten Isolat W165 der vier Testisolate. Die Kurvenverläufe deuten an, dass bei einer Konzentration von 1,5 mM Kupfer im Testmedium die Kurve wesentlich flacher verläuft, die stationäre Wachstumsphase eher erreicht und insgesamt weniger Biomasse gebildet wurde. Aus diesem Grund wurde für die beiden sensitiven Isolate (W108 u. W165) 1 mM Kupfer und für die relativ toleranten/resistenten Isolate (H11 u. H271) 1,5 mM Kupfer als maximale Kontaminationsstufe gewählt.

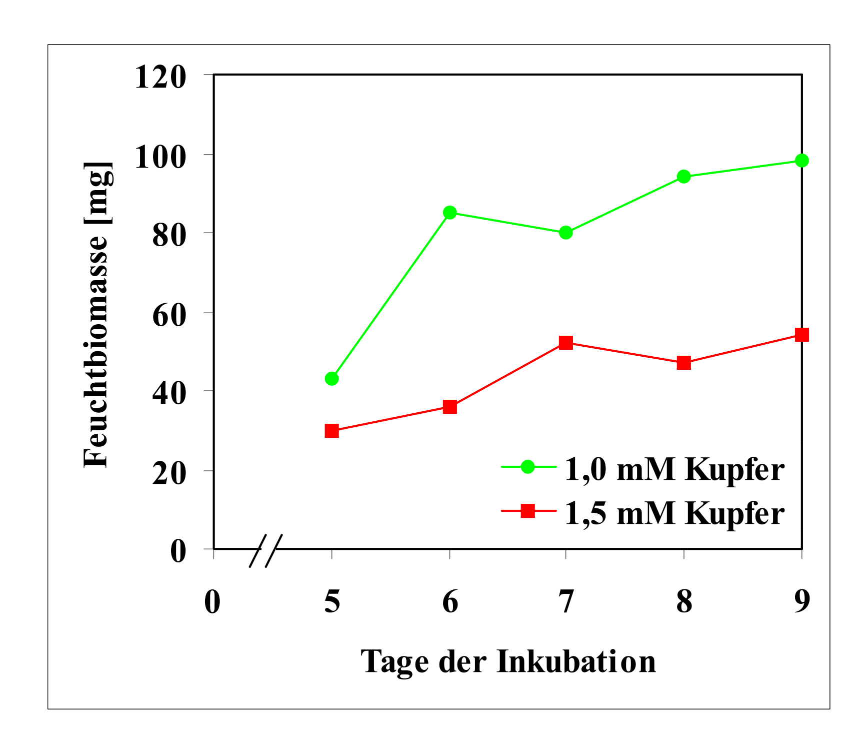


Abb. 22: Bildung von Feuchtbiomasse bei dem offensichtlich kupfersensitivsten Isolat W165 (aus Waldboden) der vier Testisolate von *P. fellutanum* in Flüssigkultur mit zwei verschiedenen Kupferkonzentrationen (n = 1). Bei einer Konzentration von 1,5 mM Kupfer wurde die stationäre Wachstumsphase eher erreicht und insgesamt weniger Feuchtbiomasse gebildet als bei 1 mM Kupfer.

Auch der geeignete Zeitpunkt der Myzelernte wurde in einem Vorversuch ermittelt. Hierzu wurden mehrere Parallelen eines Isolats von *P. fellutanum* in 150 ml unbelasteter Flüssigkultur angezogen. Zwischen zwei und sieben Tagen Inkubation wurden pro Tag drei Parallelen geerntet und ihre Feuchtbiomasse bestimmt. Wie aus der Abbildung 23 zu entnehmen ist, lag nach drei Tagen Inkubation genügend Feuchtbiomasse vor und die Kultur war noch nicht zu alt, da die stationäre Wachstumsphase, in der es bereits zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellbestandteile kommen kann, zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht war. Die Analyse von Ansätzen mit relativ toleranten/resistenten Pilzen und gering gestressten sensitiven Pilzen erfolgte daher in der Regel nach drei Tagen Inkubation. Nur Ansätze mit sensitiven Isolaten bei den beiden höchsten Kupferkonzentrationen wurden nach fünf Tagen analysiert.

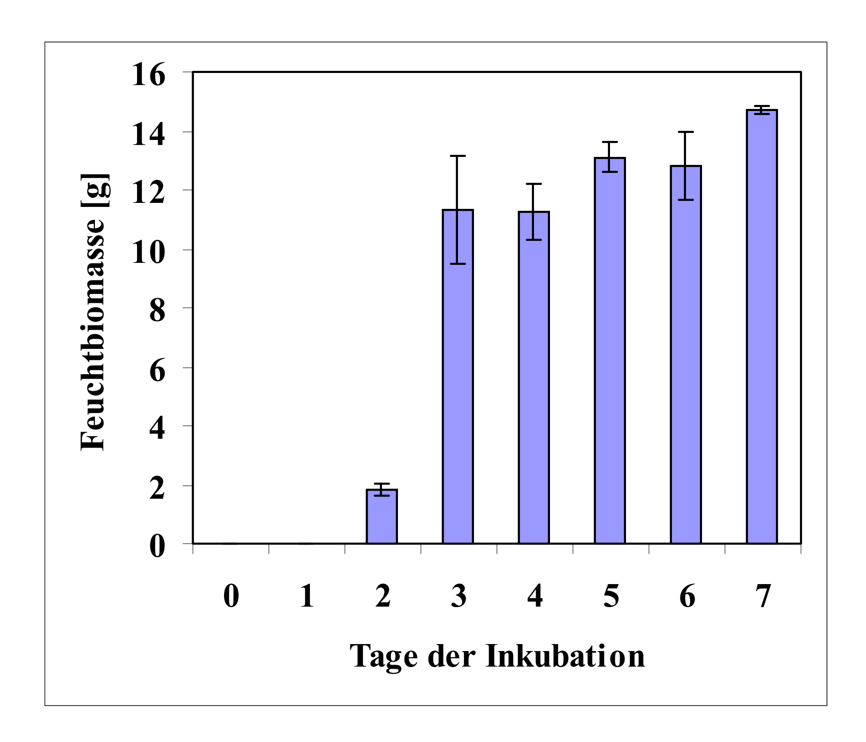


Abb. 23: Bildung von Feuchtbiomasse bei *P. fellutanum* in 150 ml unbelasteter Flüssigkultur (n = 3). Nach drei Tagen Inkubation lag einerseits genügend Feuchtbiomasse für Aufschlüsse vor, andererseits war die stationäre Wachstumsphase noch nicht erreicht.

Die Erstellung von Eichkurven für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) und die Bestimmung der Sulfhydryl (SH)-Gruppen nach Ellman (1959) erfolgte gemäß Kapitel 2.2.3.2.2. Für die Proteinbestimmung wurden zwei Eichkurven verwendet, um unterschiedliche Konzentrationsbereiche erfassen zu können. Die in den Abbildungen 24 und 25 gezeigten Eichkurven decken die Proteinkonzentration zwischen 100-1000 µg ml^{-1} bzw. 10-100 µg ml^{-1} ab. Ein Beispiel einer Eichkurve für die SH-Gruppenbestimmung durch das *Ellman*-Reagenz zeigt die Abbildung 26. Wegen seiner Instabilität musste das Reagenz nach drei Monaten erneuert und folglich auch die Eichkurve neu aufgenommen werden.

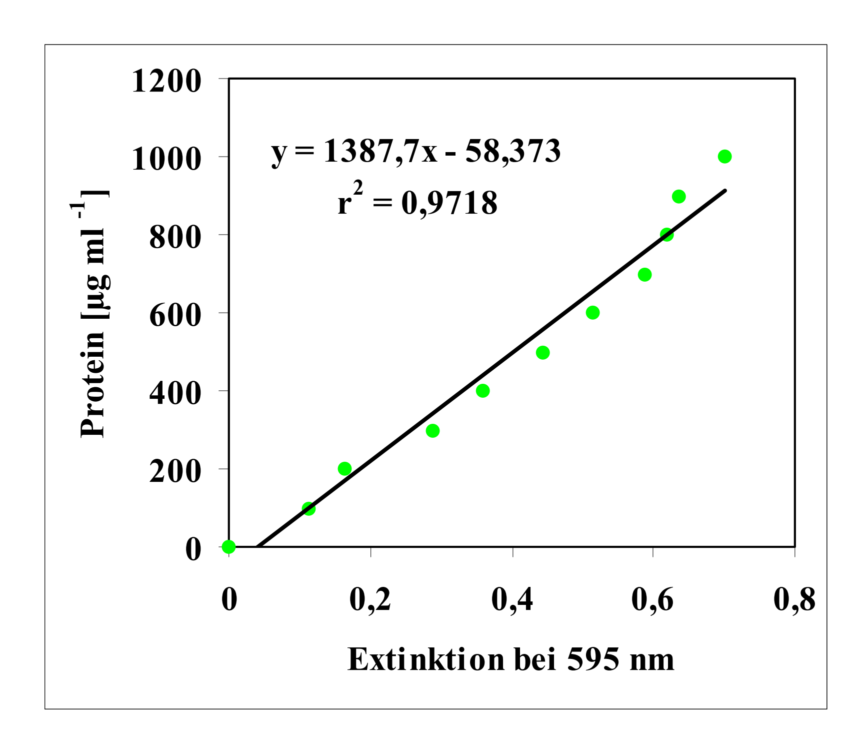


Abb. 24: Protein-Eichkurve für den Konzentrationsbereich 100-1000 µg ml^{-1}.

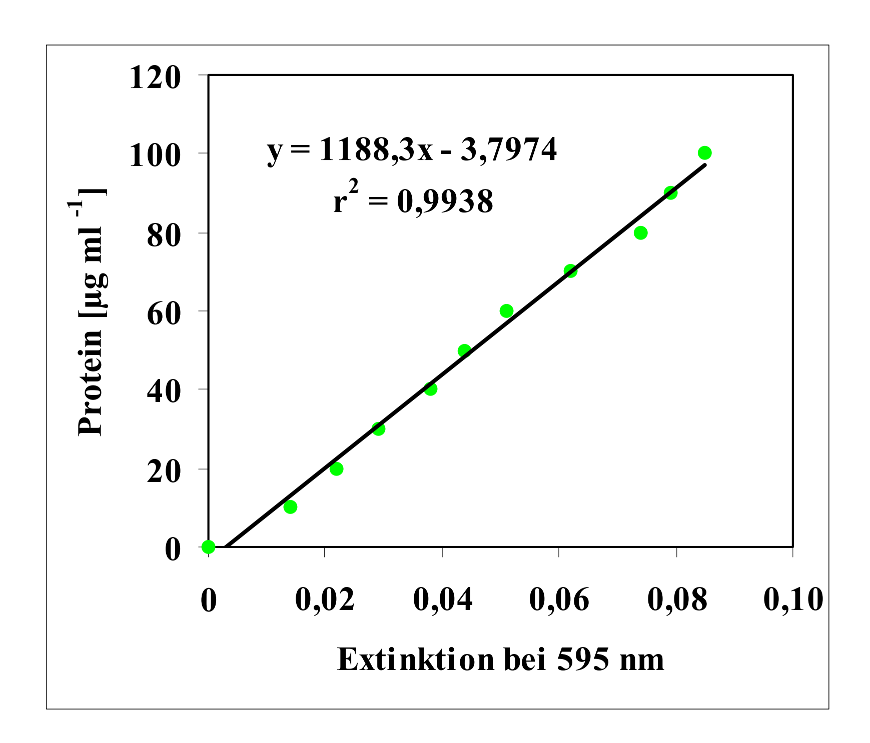


Abb. 25: Protein-Eichkurve für den Konzentrationsbereich 10-100 µg ml^{-1}.

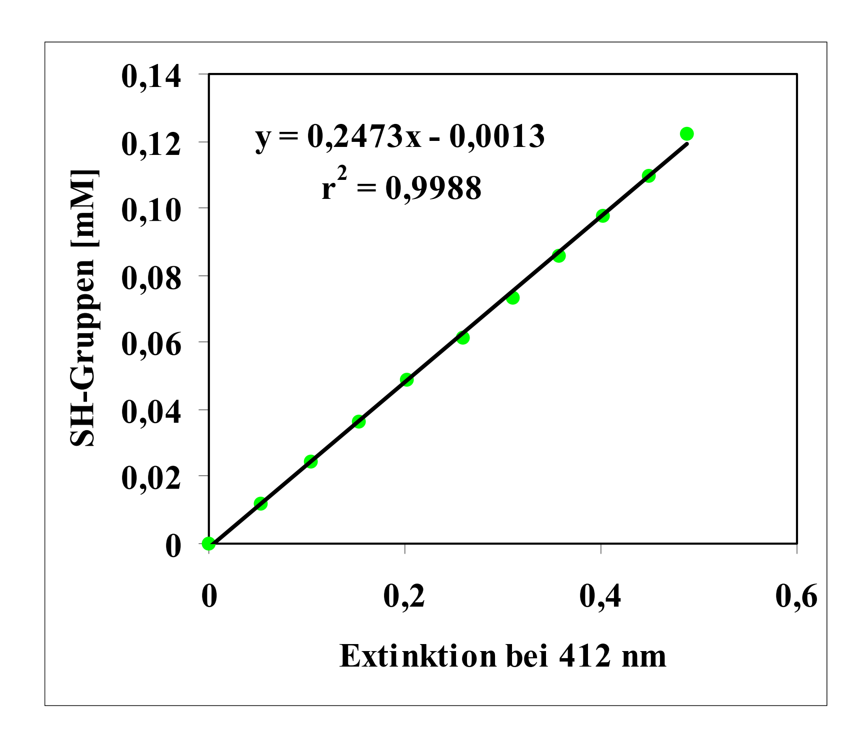


Abb. 26: Beispiel für eine Eichkurve zur Bestimmung des SH-Gruppen-Gehalts von Zellaufschlüssen.

Der Einfluss von Kupfer in der Nährlösung auf die Biomassebildung, den Proteingehalt der Zellen und den Schwefelgehalt der Sulfhydrylgruppen (SH-S) bei den vier ausgewählten Isolaten von *P. fellutanum* ist in der Tabelle 35 dargestellt. Je Isolat und Kontaminationsstufe wurden zwei Parallelen untersucht, die jeweils in zwei Zeilen untereinander stehen. Wie zu erkennen ist, verloren die beiden Isolate aus Haldenboden unter Kupfereinfluss nur relativ wenig Biomasse, die Isolate aus Waldboden dagegen deutlich mehr, wobei Isolat W165 noch stärker betroffen war als W108. Die Werte für Protein nahmen bei allen vier Pilzen in der Tendenz ähnlich, aber relativ etwas stärker ab als die Biomasse. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten aus Haldenboden und Waldboden. Bei einer Konzentration von 1 mM Kupfer im Medium war die Proteinsynthese der beiden Haldenisolate auf Werte zwischen 55 % und 60 % der ungestressten Kontrolle abgefallen, die der beiden Waldisolate sogar auf Werte zwischen 2 % und 14 %. Dagegen betrug die relative Synthese von Sulfhydrylgruppen bei den beiden Isolaten aus Haldenboden jeweils etwa 32,5 % und bei den Isolaten aus Waldboden 20,8 % bzw. 4,1 %.

Tab. 35: Bildung von Biomasse, Protein und Sulfhydrylgruppen in ausgewählten Isolaten von *P. fellutanum* aus Halden- (H) und Waldboden (W) in 150 ml Flüssigkultur (Vollmedium nach Martin, 1950) und Gegenwart von Kupfer (n = 2).

Isolat-Nr.	Parameter	Kupfer im Nährmedium [mM] 0	0,5	1,0	1,5
H11	Biomasse [mg]	509,0	401,0	285,0	382,0
		482,0	362,0	457,0	363,0
	Protein [mg]	73,1	55,1	35,7	20,1
		73,3	57,6	44,9	19,7
	SH-S [µg]*	64,3	32,2	18,3	11,1
		66,3	31,5	24,2	12,3
H271	Biomasse [mg]	797,0	713,0	714,0	688,0
		818,0	823,0	755,0	676,0
	Protein [mg]	118,5	94,8	69,4	48,4
		123,0	105,1	77,3	52,4
	SH-S [µg]*	144,1	62,4	47,2	25,4
		146,8	77,0	47,1	29,6
		0	0,33	0,67	1,00
W108	Biomasse [mg]	628,0	549,0	382,0	296,0
		673,0	579,0	372,0	318,0
	Protein [mg]	89,5	73,7	18,9	14,4
		88,7	76,3	29,3	11,2
	SH-S [µg]*	101,3	47,7	22,3	20,9
		97,9	58,0	34,4	20,6
W165	Biomasse [mg]	951,0	913,0	267,0	116,0
		971,0	925,0	229,0	107,0
	Protein [mg]	124,5	102,3	16,5	2,8
		118,1	102,6	16,3	2,0
	SH-S [µg]*	124,0	82,3	13,2	5,2
		115,8	74,7	10,3	4,6

*Sulfhydrylgruppen als Schwefel (SH-S) gemessen.

Aufschlussreicher als die absoluten Zahlen in der Tabelle 35 sind Verhältniszahlen, wie z.B. das Protein zu Biomasse-Verhältnis (P:B) oder das SH-Gruppen zu Protein-Verhältnis (SH:P). In den Abbildungen 27 und 28 sind relative Verhältniszahlen dargestellt, wobei das jeweilige Verhältnis in der ungestressten Kontrolle als 1 gesetzt wird. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte der in der Tabelle 35 aufgeführten Parallelen dar. Die Abbildung 27 macht deutlich, dass das Protein zu Biomasse-Verhältnis bei den beiden Waldisolaten deutlich stärker abnahm als bei den Haldenisolaten. Dagegen nahm das Sulfhydrylgruppen zu Protein-Verhältnis bei den beiden Isolaten aus Waldboden ab Kupferkonzentrationen von

etwa 0,5 mM um das 1,5- bis 2-fache zu, während dieses Verhältnis bei den Haldenisolaten sogar leicht abnahm (Abb. 28). Wird das Sulfhydrylgruppen zu Biomasse-Verhältnis gebildet, so sind keine großen Unterschiede zwischen den Herkünften aus Wald und Halde zu erkennen (nicht abgebildet). Aus der Tatsache, dass Biomasse und Protein bei den Waldisolaten stärker abnahmen als bei den Haldenisolaten, sind erstere von vornherein als sensitiver zu bezeichnen als letztere. Sowohl Waldisolate als auch Haldenisolate besitzen die offensichtlich konstitutive Fähigkeit zur Synthese von SH-Gruppen, die wahrscheinlich ubiquitär verbreitet ist (Hamer, 1986; Mehra und Winge, 1991; Nielson et al., 1985). Da diese bei den Haldenisolaten in Gegenwart von Schwermetallen unterdrückt wurde (Repression), bei den Waldisolaten dagegen verstärkt in Erscheinung trat (Induktion), muss die Fähigkeit zur Repression der Mehrsynthese von SH-Gruppen eine zusätzlich erworbene Fähigkeit darstellen.

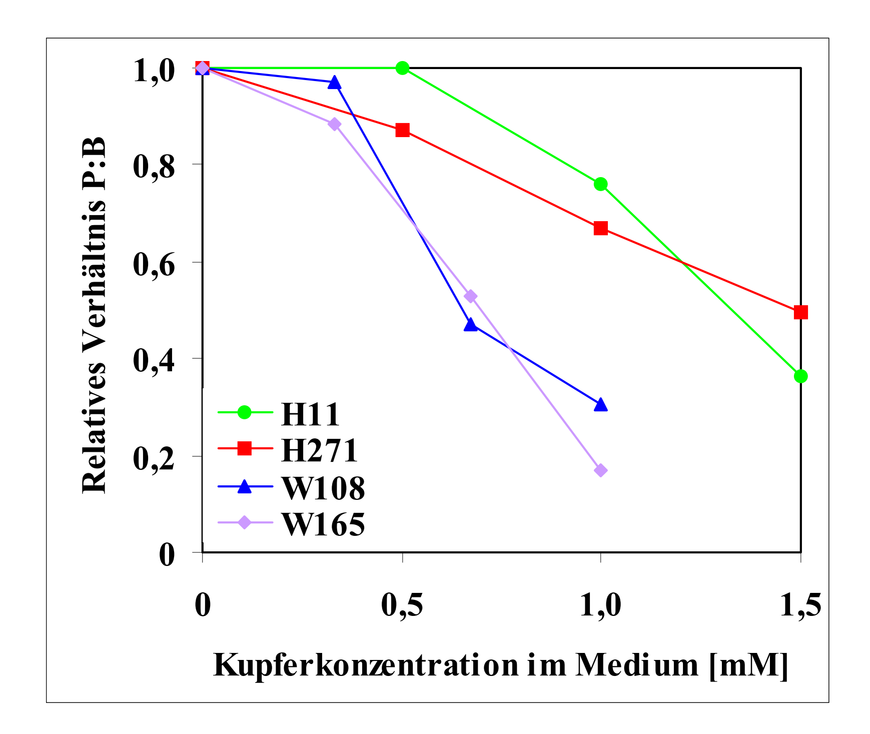


Abb. 27: Abhängigkeit des relativen Verhältnisses von Protein zu Biomasse (P:B) von der Kupferkonzentration bei Isolaten von *P. fellutanum* aus Halden- (H) und Waldboden (W). Das relative Verhältnis von P:B nahm bei den Isolaten aus Waldboden sichtbar stärker ab als bei den Isolaten aus Haldenboden.

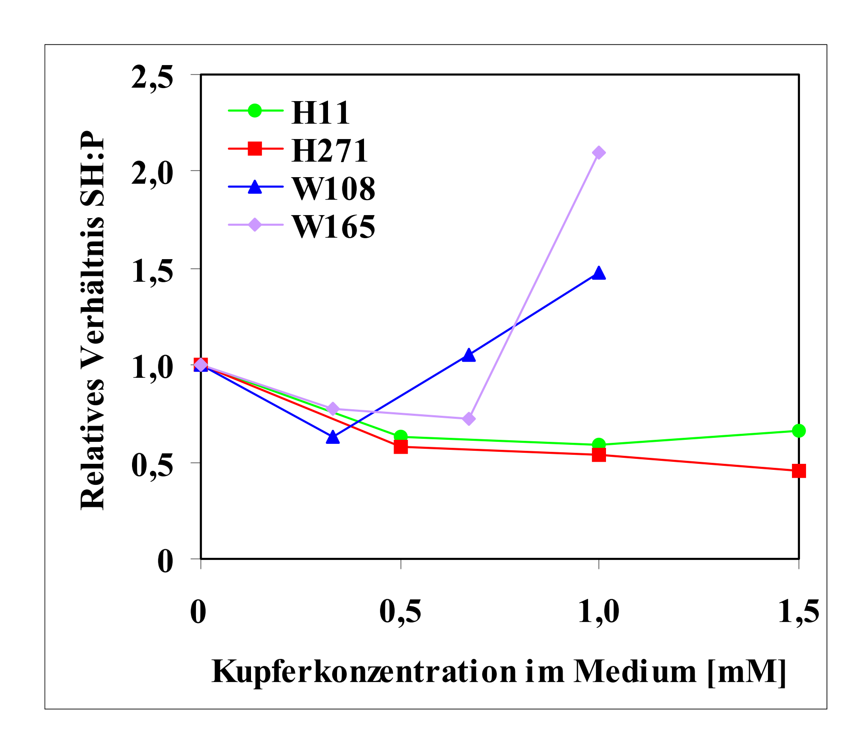


Abb. 28: Abhängigkeit des relativen Verhältnisses von SH-Gruppen zu Protein (SH:P) von der Kupferkonzentration bei Isolaten von *P. fellutanum* aus Halden- (H) und Waldboden (W). Während das relative Verhältnis von SH:P bei den Isolaten aus Haldenboden leicht abnahm, stieg es bei den Isolaten aus Waldboden um das 1,5- bis 2-fache an.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Reaktion von Bodenpilzen auf Schwermetallstress zu klären. Im Vordergrund des Interesses stand die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Diversität und katabolischer Vielseitigkeit bei diesen Organismen besteht und wie sie die durch den Stress verschärfte energetische Mangelsituation lösen. Die Untersuchungen wurden durch die Beobachtung von Wenderoth und Reber (1999 a) angeregt, wonach Bakterien unter Schwermetallstress katabolische Fähigkeiten verlieren. Das Phänomen wurde bioenergetisch begründet. Da dieser Verlust vorrangig schwerabbaubare aromatische Säuren betraf, wurde vermutet, dass diese unter Schwermetallstress ihre Substratqualität soweit einbüßen, dass sich eine Nutzung für Bakterien nicht mehr lohnt. Verlustmutanten hätten sogar einen ökologischen Vorteil, weil sie, z.B. nach Plasmidverlust, nicht mehr zur Synthese der entsprechenden Abbauenzyme gezwungen würden und dadurch schneller wachsen könnten (Bowater et al., 1996; Modi et al., 1991; Reber und Wenderoth, 1997). Der Verlust von Fähigkeiten zur Nutzung bioenergetisch ungünstiger Substrate könnte somit ein Toleranzmechanismus sein und ursächlich mit dem Überleben der Bakterien unter Stress und damit auch mit ihrer Diversität zusammenhängen.

Es war anzunehmen, dass zunehmender Schwermetallstress auch bei Pilzen zu einer Verschärfung ihrer energetischen Situation führen würde und die einzelnen Arten darauf reagieren würden. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Pilze, ähnlich wie Bakterien, mit einem Verlust katabolischer Fähigkeiten reagieren würden, war in dieser Arbeit ein Vergleich der katabolischen Vielseitigkeit von Pilzgemeinschaften und Arten aus schwermetallbelastetem und unbelastetem Boden unerlässlich. Denkbar war aber ebenfalls, dass Pilze aufgrund ihrer größeren Komplexität auf den Verlust von Abbaufähigkeiten zur Steigerung ihrer Schwermetalltoleranz nicht angewiesen sind und daher bekannte Mechanismen entwickeln bzw. optimieren. Auf jeden Fall war zu vermuten, dass diese Mechanismen und ihre Ausbildung bei einzelnen Arten unterschiedlich gut ausgeprägt sind, mit der Folge, dass es unter Stress zu Veränderungen im Artenspektrum käme. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war daher der Frage der Diversität von Pilzen auf der Art- und Gemeinschaftsebene gewidmet.

Die Diversität von Pilzgemeinschaften wurde bisher geschätzt, indem die Isolate in Stichproben unterschiedlicher Herkünfte bestimmten Arten zugewiesen und aus der Artenverteilung Diversitätsindices berechnet wurden. Diese Vorgehensweise ist praktisch nicht anwendbar, wenn mehrere, ausreichend große Stichproben je Boden analysiert werden sollen, auf die oben genannten physiologischen Untersuchungen aus Interpretationsgründen aber

nicht verzichtet werden kann. Ein Großteil dieser Arbeit bestand daher in der Entwicklung einer kombinierten Methode aus Bild- und Clusteranalyse zur Erkennung und Eingruppierung einer großen Zahl von Pilzisolaten. Die Möglichkeit, neben der Farbe von Pilzkolonien auch deren Größe und Dichte zu bestimmen, gestattete darüber hinaus, einfache Methoden zur Abschätzung der Wuchsrate aller Isolate bzw. zur Biomassebildung unter Stressbedingungen zu entwickeln.

4.1 Beurteilung der entwickelten Methoden

Die Bildanalyse ist in der Mikroorganismentaxonomie oder bei Versuchen zur Gruppierung von Mikroorganismen mehrfach angewendet worden. Bei taxonomischen Untersuchungen an Pilzen, insbesondere Fusarien, haben Newton und Kendrick (1990) sowie Gottwald et al. (1996) die Bildanalyse bei der Erkennung der Sporenmorphologie eingesetzt, während Pitt (1990) mikroskopische und makroskopische Merkmale zur Klassifizierung von Penicillien bildanalytisch bestimmte. Die Methode wurde auch zur Bestimmung von Wachstumsraten der Kolonien von Krebszellen (Slocum et al., 1990) bzw. Bakterien (Wimpenny et al., 1995) eingesetzt. Die Zählung bakterieller Kolonien auf Agarplatten ist ebenfalls beschrieben worden (Colin, 1996; 1997). Bereits 1986 gelang es Bjørnsen durch Anwendung der Bildanalysetechnik in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie, die Biomasse von Bakterioplankton aus der Fläche der Zellen im mikroskopischen Bild zu bestimmen. Eine Methode zur schnellen Abschätzung der bakteriellen Abundanz, des Biovolumens, der Morphologie und des Wachstums durch Bildanalyse entwickelten Blackburn et al. (1998). Das Wachstum von Bakterien auf Oberflächen konnte mit der Bildanalyse durch Messung wachstumsbezogener Parameter quantifiziert werden (Møller et al., 1995). Meijer et al. (1990) konnten durch morphometrische Vermessung mikroskopischer Bilder von bakteriellen Reinkulturen zeigen, dass trotz innerartlicher Variation bestehende Unterschiede zwischen Arten bildanalytisch feststellbar sind. Eine Unterscheidung von Bakterienzellen in Mischkulturen war durch interaktive (semi-automatische) Segmentierung (Kap. 2.2.2.1.3) vorher aufgenommener Bilder von Präparaten möglich (Dubuisson et al., 1994). Dass die interaktive Segmentierung digitaler Bilder oft genauer als die automatische Segmentierung ist und ein korrekter Segmentierungsablauf enorm wichtig für eine Messung mit geringer Fehlerquote ist, demonstrierten Sieracki et al. (1989) anhand der mikroskopischen Größenbestimmung fluoreszierender Zellen. Auch Tomori et al. (1998) setzten bei der Auswertung biomedizinischer Bilder die

interaktive Segmentierung ein. In der eigenen Arbeit erwies sich die interaktive bzw. semi-automatische Segmentierung, insbesondere bei der Vermessung pigmentloser Pilze (Kap. 2.2.2.1.3), als sinnvoll. Liu et al. (2001) gelang vor kurzem die mikroskopische Abschätzung der morphologischen Bakteriendiversität unter Zuhilfenahme der Bildanalysetechnik, wobei auf vorherige Isolierung und anschließende Kultivierung der Organismen verzichtet werden konnte.

Eine Methode, die, wie in dieser Arbeit entwickelt, Wachstumsdaten und Farbdaten für die Charakterisierung von Pilzen verwendet und die gewonnenen Bildanalysedaten einer Clusteranalyse, mit dem Ziel der Gruppierung ähnlich aussehender Isolate, unterwirft, ist bisher nicht bekannt geworden. Wegen der Bestimmung nur makroskopisch ermittelbarer Parameter könnte man ihr den Vorwurf machen, sie differenziere nur Phänotypen und sei daher für eine exakte Artbestimmung nicht geeignet. Letzteres war mit der Entwicklung der hier beschriebenen kombinierten Methode aus Bild- und Clusteranalyse allerdings auch nicht beabsichtigt. Vielmehr war es das Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit, eine schnelle Methode zur Abschätzung der strukturellen Diversität von Pilzgemeinschaften zu entwickeln. Dabei ist es nicht nötig, wie auch in einigen der oben zitierten Arbeiten verfahren wird, die verschiedenen pilzlichen Isolate einer Stichprobe bis zur Artebene zu identifizieren. Wichtig erschien vor allem, insbesondere beim Vergleich zweier Stichproben aus unterschiedlich kontaminierten Böden, dass diese bei der Clusteranalyse simultan analysiert, d.h. quasi wie eine Stichprobe behandelt wurden. Dass die Bildanalyse durchaus in der Lage ist, Arten zu unterscheiden, zeigte ein Versuch mit definierten Arten, die jeweils mit drei parallelen Kulturen analysiert wurden (Abb. 12). Nur bei der Art *Penicillium fellutanum*, die mit drei Isolaten in die Analyse einging, waren die Tripletts zweier Isolate durchmischt. Dies beruhte wahrscheinlich darauf, dass die sechs Kulturen dem gleichen Stamm angehörten und nicht etwa auf geringer Leistungsfähigkeit des Bildanalysesystems.

Wie Arbeiten anderer Autoren zeigten, ist eine Artbestimmung bei der Abschätzung der strukturellen Diversität von Mikroorganismengemeinschaften nicht unbedingt erforderlich. Schon Lindenbein (1952) hat die Diversität von Streptomyceten durch Analyse von Farbmustern bei Kultur auf verschiedenen Medien ermittelt, während Reber (1992) versuchte, die Diversität von Bakteriengemeinschaften aufgrund der von den einzelnen Isolaten genutzten Substrate abzuschätzen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass selbst DNA-Restriktionsmuster nicht notwendigerweise zu einer sicheren Gruppeneinteilung führen. Nach Untersuchungen von Wenderoth und Reber (1999 a) wurden durch zwei Restriktionsenzyme nur etwa 10 % der Isolate gleichen *ARDRA*-Typen (*ARDRA* = *amplified ribosomal DNA*

restriction analysis) zugeteilt. Beide Enzyme führten aber zu annähernd gleichen Diversitätsindices. Soll eine Diversitätsanalyse auf exakter Artbestimmung beruhen, müsste jedes Isolat nicht nur mit Hilfe herkömmlicher biochemischer Tests und/oder aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften bestimmt, sondern anschließend oft auch einer DNA-Sequenzanalyse unterworfen werden. Dies würde entweder die Zahl der Isolate, die in einem Arbeitsgang analysiert werden können, soweit reduzieren, dass die aus den Daten errechneten ökologischen Indices wenig aussagekräftig wären oder zu wenig Zeit für die Bearbeitung physiologischer und biochemischer Fragen lassen. Solche Untersuchungen wurden aber für die Interpretation stressabhängiger Veränderungen in der Zusammensetzung von Pilzgemeinschaften als unerlässlich erachtet.

Da die Bildanalyse auf der Erkennung von Phänotypen beruht, ist die Anwendung dieser Methode in hohem Maße von der Einhaltung konstanter Bedingungen abhängig. Diese betreffen nicht nur die Kultivierung der Pilzisolate, sondern auch den Prozess der Bildaufnahme. So müssen alle Isolate auf einem Agarmedium gleicher Zusammensetzung und Schichtdicke sowie bei gleichen Inkubationsbedingungen kultiviert werden (Kap. 2.2.2.1.2). Bei der Bildaufnahme müssen, im Gegensatz zur Fotografie, Lichtquelle, Belichtungszeit, Blende und Kameraabstand konstant gehalten werden, weil sonst identische oder sehr ähnliche Isolate nicht als solche erkannt würden. Daher ist es durchaus möglich, dass die Bilder nicht exakt mit dem subjektiven Empfinden des Betrachters übereinstimmen. Aus Gründen der Konstanthaltung der Beleuchtungs- und Belichtungsbedingungen ist auch eine sorgfältige Kalibrierung des Messsystems erforderlich (Kap. 2.2.2.1.3).

Ursprüngliches Ziel bei der Entwicklung des bildanalytischen Teils der Methode war es, formatfüllende Bilder der einzelnen Pilzkolonien aufzunehmen, um sicherzustellen, dass das Bildanalysesystem möglichst viele Strukturen, insbesondere von kleinen Kolonien, erkennen kann. Damit wäre der Wechsel zwischen mehreren Kameraabständen nötig gewesen. Zufällig wurde entdeckt, dass sich bei ändernden Kameraabständen auch die Lichtqualität des vom Objekt reflektierten Lichts änderte. So wurde z.B. ein vom Auge als schwach beige (annähernd farblos) erkannter Pilz mit abnehmendem Kameraabstand dunkler und röter (Kap. 3.1.1.1). Diese Beobachtung konnte aufgrund der Analyse von Farbtesttafeln bestätigt werden (Tab. 19). Die Erscheinung kann nur damit erklärt werden, dass sich die vom Objekt reflektierten Photonen bei Betrachtung eines Bildausschnitts nicht entsprechend vermehren, sondern auf einen größeren Teil der Bildebene (Chipfläche) verteilt werden (Verdünnungseffekt), so dass sich bei hellen Objekten der vorherrschende Farbanteil verstärkt. Umgekehrt würde bei einem größeren Kameraabstand die Zahl der Photonen auf einen Bruchteil der Chipfläche

konzentriert, so dass das Objekt heller, d.h. mit geringerem Farbanteil, abgebildet wird. Diese Tatsache hätte dazu geführt, dass Isolate der gleichen Art bzw. Farbgruppe, deren Koloniegrößen im Überschneidungsbereich zweier Kameraabstände lägen, ungewollt in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt worden wären. Aus diesem Grund mussten Bilder von allen Pilzisolaten mit einem mittleren Kameraabstand (36 cm, von Frontlinse des Objektivs bis Agaroberfläche) aufgenommen werden. Um sicherzustellen, dass dieser Kameraabstand nicht eventuell zu Farbdaten mit wesentlich schlechterer Unterscheidungskraft führte, wurden drei Kameraabstände (68 > 36 > 17 cm) in dieser Hinsicht verglichen. Die Bestimmung von Korrelationen jeder der 19 farbparameterspezifischen Datenreihen mit den 18 verbleibenden Datenreihen machte deutlich, dass diese Befürchtung unbegründet war. Die Unterscheidungskraft der Farbdaten des mittleren Kameraabstands war nur um etwa 5 % schlechter zu beurteilen als die des kleinen Kameraabstands (Tab. 20). Als Vorteil des mittleren gegenüber dem kleinen Kameraabstand musste sogar die Tatsache gewertet werden, dass im Vergleich mit dem großen Abstand nur 4,3 % der Kolonien nicht vollständig abgebildet werden konnten, mit dem kleinen Abstand dagegen 8,8 % (Abb. 8, Tab. 21). Da vorgesehen war, die nicht vollständig abgebildeten großen Pilze zur visuellen Überprüfung der Bildcluster als Vollbild darzustellen, war der zusätzliche Arbeitsaufwand, der mit dem mittleren Kameraabstand nötig war, nur etwa halb so groß wie mit dem kleinen Abstand.

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden der Cluster- und Hauptkomponentenanalyse (*PCA*) beruhen auf der Bestimmung von Korrelationen zwischen den eingesetzten Messparametern. Dabei können Objekte umso besser differenziert werden, je mehr Messparameter eingesetzt werden und je weniger diese miteinander korreliert sind bzw. je geringer die Summe aller paarweise zu ermittelnden parameterspezifischen Korrelationen ist. Im Gegensatz dazu ist die Unterscheidungskraft jedes einzelnen Parameters umso geringer, je mehr er mit allen anderen Parametern korreliert ist, d.h. je größer die Summe der Korrelationen ist. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Messparametern waren deutliche Unterschiede aufgetreten. So zeigte sich, dass die Varianz der das Wachstum der Pilze betreffenden Messwerte wegen ihrer geringen Korrelation mit den Farbparametern zu etwa 88 % an der Differenzierung der Pilze beteiligt war, die Varianz des Farbparameters *Mean Density* dagegen nur zu etwa 33 %. Dies galt für den Datensatz mit bekannten Teststämmen (Tab. 23). Bei anderen Datensätzen ist sicher mit abweichenden Werten zu rechnen, wie auch aus den zweidimensionalen Diagrammen der entsprechenden Hauptkomponentenanalysen hervorgeht (Abb. 13 u. 14), wenn diese auch nicht die Informationen liefern, wie sie die paarweise ermittelten parameterspezifischen Summen der Korrelationen (Tab. 23) wiedergeben.

Sicher haben die Farbparameter bei der hier angewandten Methode ein Übergewicht, das sich aus ihrer leichten Bestimmbarkeit ergab. Weitere Parameter, z.B. das Längen:Breiten-Verhältnis von Sporen oder die Hyphenverzweigung in Mikrokolonien, hätten zwar eingesetzt werden können, aber die Methode wegen der dafür erforderlichen Mikroskopie erheblich arbeitsaufwändiger gestaltet. Ein Parameter, der die Kreisförmigkeit (*Circularity*) von Objekten beschreibt, erwies sich bei der Differenzierung von Pilzen dagegen als wenig sinnvoll, da zufällig nicht kreisrund wachsende Kolonien von solchen typischer Wuchsform getrennt worden wären. Andererseits wäre die Einbeziehung der Koloniedichte, die bei der Abschätzung der relativen Biomassebildung im Durchlicht leicht zu bestimmen ist (Kap. 3.1.2), durchaus sinnvoll gewesen, wenn ihre Einsetzbarkeit rechtzeitig erkannt worden wäre.

Eine Steigerung der Unterscheidungskraft der hier eingesetzten Messparameter wäre auch durch eine Verbesserung der Bildqualität möglich gewesen. Wie die Abbildungen 4-7 zeigen, sind morphologische Strukturen relativ undeutlich zu erkennen, ein Umstand, der nicht nur auf der unbefriedigenden Druckqualität, sondern auch auf der ungenügenden Abstimmung zwischen Bildebene (Chipfläche der Kamera) und dem verwendeten Objektiv beruht. Der Chip der eingesetzten Fluoreszenzkamera hatte eine lichtempfindliche Fläche von 107,53 mm^2, das für die Makroaufnahmen zur Verfügung stehende Objektiv (Mikro *NIKKOR* 60 mm) ist aber für eine Kleinbildkamera mit der Bildfläche von 864 mm^2 vorgesehen und hat in Verbindung mit der Kamera eine ausgesprochene Tele-Funktion (8-fach). Die Verwendung einer *Sony*-Kamera in Kombination mit einem für Makroaufnahmen offensichtlich besser geeigneten Objektiv führte im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Firma *Nikon* (Düsseldorf) zu Aufnahmen einer wesentlich besseren Qualität (Stelzer et al., 1999), so dass insbesondere Unterschiede zwischen den Pilzen hinsichtlich der Verteilung von Farben und Helligkeitswerten (z.B. *Bright Variation*) größer gewesen wären.

Wie schon dargelegt wurde, handelt es sich bei der hier vorgestellten Methode zur Gruppierung von Pilzisolaten um eine Kombination aus Bild- und Clusteranalyse. Aus der Tatsache, dass in einem Kontrollversuch zur Überprüfung der Methode jeweils drei gleichzeitig angeimpfte Kolonien einer Art im Dendrogramm immer als Triplett auf hoher Ähnlichkeitsstufe auftraten, konnte auf eine ausreichend hohe Spezifität der Bilddaten geschlossen werden (Abb. 12 b). Da aber durchaus geringe Unterschiede zwischen den Tripletts zu erkennen waren und andererseits unterschiedliche Stämme von *Penicillium fellutanum* auf einer weniger hohen Ebene clusterten, entstand das Problem, welche Clusterebene bei einer unbekannten Stichprobe mit einer größeren Zahl unterschiedlicher Stämme der gleichen Art zu wählen sei. Bei der Clusteranalyse von biologischem Datenmaterial wird die Clusterebene,

d.h. die Distanz- bzw. Ähnlichkeitsstufe, auf der die Gruppenbildung erfolgt, häufig *a priori* festgelegt. Wenn es sich um DNA-Fragmente handelt, kann als Clusterebene eine Ähnlichkeitsstufe von 100 % durchaus optimal sein. Dies ist aber bei der Clusterung von Phänotypen, z.B. in der Chemotaxonomie, nicht der Fall. Gleiches gilt für die Gruppierung von Pilzbildern bzw. den entsprechenden Bilddaten. Da bei den Bilddaten von Stämmen einer Art mit einer gewissen Varianz zu rechnen war und zusammengehörende Stämme in einem Cluster zusammengefasst werden sollten, musste die Clusterebene auf einer Ähnlichkeitsstufe unter 100 % liegen. Ziel war es, eine Clusterebene zu finden, die sich an immer wechselnde Stichproben anpasst und in einer Stichprobe gleichzeitig sowohl seltene als auch häufige Bildtypencluster entstehen lässt. Eine solche Situation ergibt sich bei einer jeweils von der Zusammensetzung der Stichprobe abhängigen *evenness* (Gleichmäßigkeit) in der Stichprobe. Da in Dendrogrammen mit abnehmender Knotenzahl (Zählrichtung s. Abb. 9-11) die *evenness* der resultierenden Datencluster (Bildtypen) abnimmt, wobei mehrere Minima auftreten (Abb. 15), wurde die Clusterebene so gelegt, dass sie mit dem ersten *evenness*-Minimum zusammenfiel. In dem dargestellten Beispiel (Abb. 15) entsprach dies einer Ähnlichkeitsstufe von ca. 97 % und einer Typenzahl von etwa 75 in 274 Isolaten bzw. durchschnittlich etwa vier Isolaten je Bildtyp. Es ist klar, dass bei dieser Vorgehensweise Arten zerschnitten werden können, z.B. wenn ein Bildtyp sich nach Kernsegregation (Buxton, 1954; Hoffmann, 1964) zu einem anderen Phänotypen (Bildtypen) entwickelt. Sehr ähnlich aussehende Arten, wie z.B. *P. fellutanum* und *P. frequentans*, können auch zu einem Bildtypen zusammengefasst werden, wenn die Clusterebene nicht hoch genug liegt. Dieser Sachverhalt macht klar, dass selbst die Anpassung der Clusterebene an den jeweiligen Datensatz kein Garant für eine fehlerfreie Arteneinteilung ist. Das Problem der Clusteranalyse ist die Starrheit der Clusterebene. Wegen der geschilderten Problematik wurden für vergleichende physiologische Untersuchungen an Stämmen aus schwermetallbelastetem und unbelastetem Boden solche Bildtypen ausgewählt, die auf einer sehr hohen Ähnlichkeitsstufe clusterten. Eine taxonomische Überprüfung (Dr. Draeger, Institut für Mikrobiologie der *T.U. Braunschweig*) zeigte, dass diese Bildtypen alle zu *P. fellutanum* gehörten. Die hier vorgestellte Methode zur Abschätzung der Pilzdiversität hat den großen Vorteil, dass alle Proben durch das Clustern auf einer durch das erste *evenness*-Minimum definierten Ähnlichkeitsstufe der gleichen Behandlung unterworfen werden. Sie wird für besser als solche Methoden gehalten, bei denen die Bestimmung der Isolate zum einen zur Art, zum anderen aber nur zur Gattung erfolgt (z.B. Jordan und Lechevalier, 1975; Nordgren et al., 1985).

Neben der kombinierten Methode aus Bild- und Clusteranalyse zur Abschätzung der strukturellen Diversität von Stichproben aus Pilzgemeinschaften wurde in dieser Arbeit ein weiteres bildanalytisches Verfahren entwickelt, das erlaubt, die relative Biomassebildung von Pilzen bei Wachstum auf festem Medium aus dem Produkt von relativer Koloniedichte (Extinktion im Durchlicht) und relativer Koloniefläche abzuschätzen (Kap. 3.1.2). Ziel war die möglichst genaue Erfassung von Schwermetallwirkungen auf der Stammebene. Dabei stand die Auffindung von Pilzstämmen, die hinsichtlich ihrer Toleranz/Resistenz gegenüber Schwermetallen unterschiedlich reagierten (*Screening*), im Vordergrund des Interesses. Wie die Daten der Abbildungen 20 und 21 zeigen, ist die bildanalytische Methode für diesen Zweck geeignet. Durch die gleichzeitige Bestimmung von Koloniefläche und Koloniedichte vermittelt sie sogar ein differenzierteres Bild der Reaktion der einzelnen Pilze auf Schwermetalle als die Ermittlung der Biomasse allein. Wäre z.B., wie sonst üblich, nur das Wachstum als Kriterium der Schwermetalltoxizität herangezogen worden, so hätten sich bei *Penicillium fellutanum* praktisch keine Unterschiede zwischen den Isolaten aus Wald bzw. Halde ergeben (Abb. 21). Die größere Sensitivität der Waldisolate dieser Art wird erst dann erkennbar, wenn auch die Koloniedichte berücksichtigt wird. Umgekehrt nimmt bei *P. nigricans* die Koloniefläche (Wachstum) stärker ab als die Koloniedichte (Abb. 20). Aufgrund der Art und Weise, wie die relative Biomasse berechnet wird, nimmt sie bei geringen Konzentrationen im Toxizitätstest stärker ab, als die beiden tatsächlich gemessenen Parameter.

4.2 Wirkung von Schwermetallen auf Diversität und katabolische Vielseitigkeit von Bodenpilzen auf der Gemeinschaftsebene

Untersuchungen zum Einfluss von Schwermetallen auf die Diversität von Bodenpilzen schlossen die Messung von Wachstumsraten und die Bestimmung von Farbparametern ein. Allein schon die Sortierung aller aus den einzelnen Böden isolierten Pilze nach ihrer Wachstumsrate machte deutlich, dass diese physiologische Eigenschaft zumindest auf der Gemeinschaftsebene durch Schwermetalle beeinflusst wird (Abb. 16 u. 17). Durch Angabe der gemeinschaftsspezifischen Verteilung der Wuchsraten als Indices, wie z.B. deren Durchschnittswert, der mittleren Abweichung von diesem Wert und des davon abgeleiteten Variationskoeffizienten, konnten vorhandene Unterschiede in der durchschnittlichen Wuchsleistung der Pilzgemeinschaften, je nach ihrer Herkunft, quantifiziert werden (Tab. 25). Das durchschnittliche Wachstum der Pilze nahm dabei in der Reihenfolge Acker wb > Wald ub >

Halde b > Acker b ab, wobei nicht alle Unterschiede gesichert waren. Die Variabilität des Wachstums und damit auch seine Diversität, erkennbar am mittleren Variationskoeffizienten, nahm in der Reihenfolge Acker wb > Acker b > Wald ub > Halde b ab. Auch hier waren nicht alle Unterschiede gesichert. Grundsätzlich sind für das beobachtete Phänomen zwei Erklärungen möglich: entweder ändern sich die einzelnen Pilzarten unter dem Schwermetalleinfluss im Boden so stark, dass sie auch im Test ohne Schwermetalle langsamer wachsen oder es kommt bei weitgehend konstanter Wuchsleistung der Arten zu einer Verschiebung im Artenspektrum. Durch Vergleich zweier Bildtypen, die aufgrund taxonomischer Bestimmung den Arten *Penicillium nigricans* und *P. fellutanum* angehörten (Tab. 31), erwies sich die erste Alternative als weitgehend gegenstandslos. Isolate dieser Arten aus belasteten Böden wuchsen nicht langsamer als solche aus unbelasteten Böden.

Dagegen kann das geringere durchschnittliche Wuchspotential der Pilze aus belastetem Acker im Vergleich zu den Isolaten aus wenig belastetem Acker damit erklärt werden, dass Stress, physiologisch gesehen, eine Abnahme der Substratqualität bedeutet, wie an dem langsameren Wachstum von Pilzen auf kontaminierten Nährböden zu erkennen ist (Tab. 34). Offensichtlich sind langsamer wachsende K-Strategen an diese Bedingungen besser angepasst, als die schneller wachsenden r-Strategen (u.a. Phycomyceten), so dass sie sich auf Kosten letzterer relativ anreichern können. Dieses Verhalten der Bodenpilze steht im Gegensatz zur Selektion von r-Strategen bei Bakterien (Wenderoth und Reber, 1999 a; Wenderoth et al., 2001), so dass man von unterschiedlichen Überlebensstrategien ausgehen kann. Bei Bakterienarten reichern sich unter Stress Stämme geringerer katabolischer Vielseitigkeit an (Wenderoth et al., 2001), wobei insbesondere Fähigkeiten zur Nutzung schwer abbaubarer Substrate verloren gehen. Dies scheint ein ökologischer Vorteil zu sein. Da Pilze katabolische Fähigkeiten offensichtlich nicht verlieren (Tab. 27 u. 28), müssen sie auf den durch Stress verstärkten Energiemangel mit anderen Mechanismen reagieren (s. unten). Das Verschwinden schnellwüchsiger Arten äußert sich auch in der Tatsache, dass der Variationskoeffizient der Wachstumsraten der Pilze aus belastetem Ackerboden geringer war als derjenige der Isolate aus wenig belastetem Ackerboden (Tab. 25). Im Gegensatz zu den Verhältnissen in den Ackerböden (Bodenpaar I) ließen sich die Unterschiede in der Wuchsleistung zwischen den Pilzen aus unbelastetem Wald- und schwermetallbelastetem Haldenboden statistisch nicht sichern. Dies muss darauf zurückgeführt werden, dass der pH-Wert in beiden Böden sehr niedrig war (~ 3,4), so dass schon von einem gewissen Stress im Waldboden ausgegangen werden konnte, der durch den hinzukommenden Schwermetallstress im Haldenboden augenscheinlich nicht wesentlich verstärkt wurde.

Gründe, die neben dem pH-Wert für den relativ geringen Unterschied der durchschnittlichen Wuchsleistung der Pilze aus den jeweils unbelasteten Böden der beiden Paare von Bedeutung sein könnten, sind möglicherweise die Verfügbarkeit der Kohlenstoff (C)- und Energiequellen, aber auch die Wasserkapazität der Böden. Durch den Bewuchs mit *Lolium perenne* L. (*Gramineae*) (Schmeil und Fitschen, 1982) entsteht im wenig belasteten Ackerboden leicht abbaubares Pflanzenmaterial (lösliche Zucker, Pektin oder Stärke; Pugh, 1980), welches die relativ hohe durchschnittliche Wuchsleistung, z.B. der *Zuckerpilze* (Burges, 1939), verursacht. Die geringere Qualität der C-Quellen im sandigen Waldboden (*Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. (*Gramineae*) (Schmeil und Fitschen, 1982) und Kiefernnadeln), die unter gleichen Bedingungen weniger schnell wachsende Pilze selektionieren würde, könnte eventuell durch den Wechsel von extremer Austrocknung und Wiederbefeuchtung kompensiert werden, so dass r-Strategen offensichtlich fast genauso gefördert werden wie im Ackerboden mit seinem durch hohen Lehmanteil größeren Wasserhaltevermögen. Wiederbefeuchten trockenen Bodens bewirkt ein als *flush* bekannt gewordenes Phänomen (Birch, 1958; Jenkinson, 1966; Powlson, 1976), das schnell wachsende Pilze fördert, die bei der anschließenden Austrocknung Sporen bilden. Diese traten im Waldboden aufgrund der angewandten Isolierungsmethode wahrscheinlich besonders häufig auf.

In diesem Zusammenhang muss auch der Variationskoeffizient des Wachstums der Pilze in den einzelnen Stichproben gesehen werden (Tab. 25). Dieser war z.B. im wenig belasteten Ackerboden in drei Versuchen höher als im unbelasteten Waldboden. Die relativ konstante Bodenfeuchte im wenig belasteten Ackerboden könnte dafür verantwortlich sein, dass auch langsamwüchsige Pilze wachsen, wenn gute C-Quellen verbraucht sind und die schnell wachsenden Arten wegen Energiemangels sporulieren, auf Nährböden aber erscheinen. Im Waldboden dagegen könnte die Entfaltung der K-Strategen nach Entwicklung der r-Strategen durch häufiger auftretende Austrocknung immer wieder unterbrochen werden, während letztere mit den durch die Trockenheit teilweise konservierten guten C-Quellen ihr Wachstum fortsetzen können. Der belastete Acker hatte sogar ein etwas höheres Wasserhaltevermögen als der wenig belastete (Fließbach et al., 1994), ein möglicher Grund dafür, dass der Variationskoeffizient der Wuchsleistung immer noch höher war als im unbelasteten Waldboden. Dagegen konnte die hohe Schwermetallbelastung des Haldenbodens wahrscheinlich nicht durch sein gutes Wasserhaltevermögen kompensiert werden, so dass der Variationskoeffizient der Wuchsleistung besonders niedrig war.

Die bildanalytische Abschätzung der strukturellen Diversität von jeweils etwa 400 Pilzisolaten aus den vier Testböden zeigte, dass die auf gleiche Stichprobengröße (125 Isola-

te) bezogene Zahl der Bildtypen (die als Index der Diversität dem *Shannon-Index* vorgezogen wurde) in der Reihenfolge Acker wb > Acker b > Wald ub > Halde b abnahm (Tab. 26). Bei ausschließlicher Betrachtung von Mittelwert und Standardabweichung waren die Unterschiede innerhalb der beiden Bodenpaare nicht signifikant. Gesichert war nur der Unterschied zwischen den beiden Ackerböden und dem Haldenboden. Wertet man dagegen die drei Einzelversuche paarweise nach dem Zeitpunkt ihrer Probenahme aus, so kann wenigstens von einer höheren Pilzdiversität im Waldboden im Vergleich zum Haldenboden ausgegangen werden, weil zu allen Probenahmezeitpunkten eine höhere Zahl von Bildtypen gefunden wurde (Tab. 26). Schließt man den Variationskoeffizienten der Zahl der Bildtypen in die Beurteilung der Ergebnisse ein, so ließe sich eventuell noch ein weiterer Unterschied zwischen den gestressten und ungestressten Varianten jedes Bodenpaars ablesen. Der höhere Wert der ungestressten Gemeinschaften würde, falls er durch weitere Versuche bestätigt werden könnte, wie der Variationskoeffizient des Wachstums, auf die bessere Reaktionsfähigkeit ungestresster Gemeinschaften gegenüber Störungen (z.B. C-Eintrag, kurzfristige Pestizideinwirkung) hinweisen. Ein hoher Variationskoeffizient der Diversität könnte bedeuten, dass die Gesamtdiversität, über eine ganze Vegetationsperiode betrachtet, höher ist als die zu einzelnen Stichprobenzeiten gemessene und insbesondere auch höher als die Gesamtdiversität einer Gemeinschaft mit geringem Variationskoeffizienten. Möglicherweise verändert sich die Diversität der Pilze, wie die mikrobielle Biomasse des Bodens (Anderson, 1994; Reber und Wenderoth, 1997), im Laufe eines Jahres und die Amplitude dieses Zyklus wird durch Schwermetallstress verringert.

Dass der Zeitpunkt der Isolierung eine wichtige Rolle für die Abschätzung der Diversität bzw. die Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften spielt, geht aus dem Dendrogramm in der Abbildung 29 hervor. Vor dessen Erstellung wurde für jeden der zwölf Datensätze eine *PCA* durchgeführt, bei der für jeden der 20 Messparameter zwei Hauptkomponenten ermittelt wurden. Dies reduzierte die Gesamtzahl der Daten von 2600 je Stichprobe (130 Isolate à 20 Messparameter) auf 40 Hauptkomponenten. Erst diese reduzierten Datensätze wurden der Clusteranalyse unterworfen. Das Dendrogramm zeigt, dass zumindest vier der sechs Datensätze der Proben aus Ackerböden auf dem linken Ast des Dendrogramms angeordnet sind und damit eine große Ähnlichkeit untereinander signalisieren. Dabei sind die Ähnlichkeiten zwischen den zum gleichen Zeitpunkt entnommenen Proben aus belastetem und wenig belastetem Ackerboden (A wb1 u. A b1; A wb2 u. A b2) sogar größer als zwischen den Proben aus dem selben Boden. Gleiches gilt für die beiden Proben, die im rechten Ast angeordnet sind (A wb3 u. A b3).

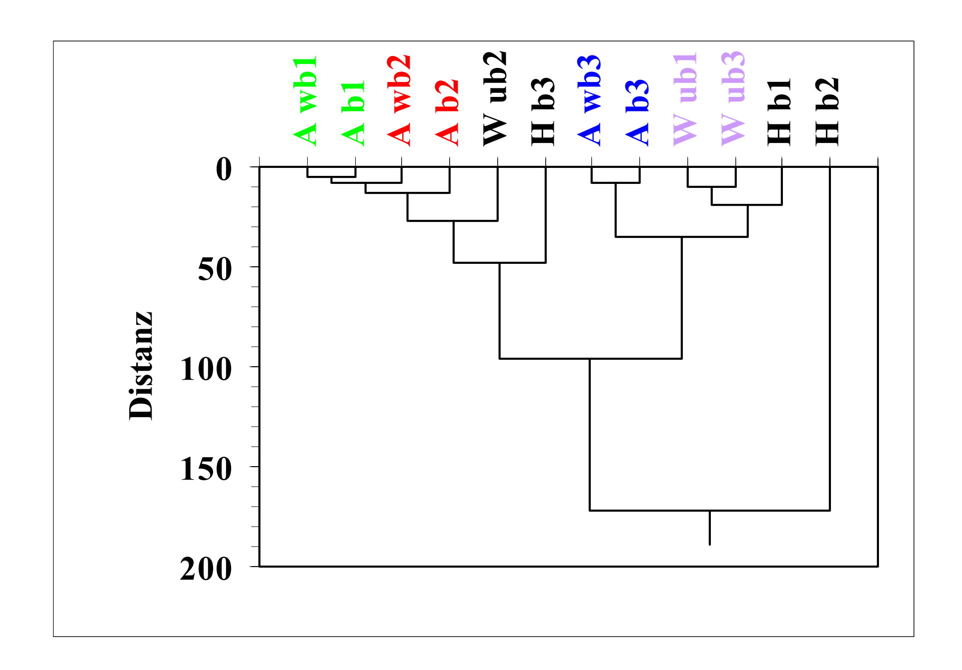


Abb. 29: Dendrogramm nach Clusteranalyse der 40 hintereinander angeordneten Hauptkomponenten (zwei für jeden der 20 Messparameter) jeder Stichprobe. Es clustern überwiegend Datensätze gleichen Probenahmezeitpunkts und nicht gleicher Belastungsstufe zusammen. Bodenpaar I: Ackerböden (A), wb = wenig belastet, b = belastet. Bodenpaar II: Wald- (W) und Haldenboden (H), ub = unbelastet, b = belastet.

Eine entsprechende Übereinstimmung zwischen den Pilzgemeinschaften aus Wald- und Haldenboden existiert verständlicherweise nicht, obwohl auf pH-Gleichheit und gleichen Bewuchs geachtet wurde. Die Tatsache, dass beide Bodentypen Unterschiede in der Korngrößenverteilung und im Wasserhaltevermögen aufweisen und etwa 100 km voneinander entfernt sind, hatte anscheinend größeres Gewicht. Die größere Ähnlichkeit zwischen Proben gleichen Entnahmedatums als zwischen Proben gleicher Belastung bei den Ackerböden macht nicht nur deutlich, dass es sinnvoll ist, Proben gleichen Isolierungszeitpunkts zu vergleichen, sondern weist indirekt auch auf die Güte der Bildanalysedaten für Diversitätsanalysen hin.

Die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede hinsichtlich der strukturellen Diversität von Pilzgemeinschaften zwischen den Varianten der beiden Bodenpaare waren so gering, dass sie statistisch nicht gesichert werden konnten. Dagegen waren zumindest zwischen den beiden Ackerböden Unterschiede hinsichtlich der Wachstumsrate der Pilze (Durchschnittswert u. Variationskoeffizient) sicher. Dies kann als Indiz dafür gelten, dass die strukturelle Diversität bei Pilzen als ein Indikator für Stresswirkungen weniger empfindlich ist als Durchschnittswert und Variationskoeffizient des Wachstums. Die vermeintlich geringe Empfindlichkeit der Diversität in den Ackerböden gegenüber Schwermetallen könnte aber auch andeuten, dass im

Laufe der Jahre (die letzte Aufbringung schwermetallhaltigen Klärschlamms auf die Parzellen lag zur Zeit der ersten Probenahme etwa zehn Jahre zurück) eine Rediversifizierung im belasteten Boden stattgefunden hat. Diese kann man sich so vorstellen, dass einige der schnellwüchsigen Arten durch stressadaptierte langsamwüchsige Arten ersetzt wurden. Immerhin ist in schwermetallbelasteten Böden eine Rediversifizierung von Bakterien beobachtet worden (Barkay et al., 1985). Im Gegensatz zu den hier an Pilzen gewonnenen Ergebnissen erbrachten die von Wenderoth (1998) angestellten Untersuchungen zur strukturellen Diversität von Bakterien aus den gleichen Ackerböden gesicherte Unterschiede zwischen den beiden Böden. Man kann daher davon ausgehen, dass Pilze auf Schwermetalle weniger empfindlich reagieren als Bakterien. In ähnliche Richtung weisen wahrscheinlich auch Ergebnisse von Anderson und Domsch (1994), die zeigen konnten, dass bei zunehmendem Protonenstress in Waldstandorten der Anteil der pilzlichen Atmung gegenüber der bakteriellen Atmung zunimmt.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse zum Einfluss von Schwermetallen auf die Diversität von Pilzen sind nicht die ersten ihrer Art. Zu nennen sind vor allem Untersuchungen von Jordan und Lechevalier (1975) sowie schwedische Arbeiten (Arnebrant et al., 1987; Nordgren et al., 1983; 1985). Beide Gruppen untersuchten Böden, die mit bis zu 13,5 % Zn (Jordan und Lechevalier, 1975) bzw. je 2 % Cu und Zn (Nordgren et al., 1983) wesentlich stärker belastet waren als z.B. der hier untersuchte Haldenboden (ca. 0,3 % Pb), so dass Unterschiede in der Arten- bzw. Gattungszusammensetzung zwischen belasteten und wenig belasteten Böden leichter nachweisbar waren. Genaue Angaben zur Artendiversität sind diesen Arbeiten aber nicht zu entnehmen. Berechnet man aus den von Jordan und Lechevalier (1975) auf sehr unterschiedlichen Stichproben beruhenden Daten sog. *rarefaction*-Kurven (s. Abb. 3), so sind Unterschiede bezüglich des Artenreichtums gleich großer Stichproben ebenfalls nicht signifikant. Nordgren et al. (1985) geben in ihrer umfangreichen Arbeit zwar den *Shannon-Index* der allgemeinen Diversität an, es fehlen jedoch Angaben, auf welche Stichprobengröße sich dieser bezieht. Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit wenig Wert auf qualitative Unterschiede gelegt, d.h. hinsichtlich der Artenzusammensetzung der Pilzgemeinschaften, dafür umso mehr auf quantitative Unterschiede, also hinsichtlich des Informationsgehalts der Pilzgemeinschaften (Typenreichtum).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Schwermetallen auf die katabolische Vielseitigkeit von Pilzgemeinschaften in Böden zu untersuchen. Sie war als Kehrwert des Variationskoeffizienten substratspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) bzw. reziproker Abbauzeiten *in situ* definiert worden (Kap. 2.2.4, Gleichung 9). Dabei dienten

21 aromatische Säuren als Testsubstrate unterschiedlicher energetischer Wertigkeit. Da die katabolische Vielseitigkeit ein Verteilungsindex von Abbaufähigkeiten ist, wurde die *evenness* der substratspezifischen Messwerte aus Vergleichsgründen mit herangezogen. Die Ergebnisse der *CFU*-Methode (Tab. 27 u. 28) zeigen, dass weder in Bodenpaar I (Ackerböden) noch in Bodenpaar II (saure Naturböden) signifikante Unterschiede in der Verteilung aromatenspezifischer Abbaufähigkeiten durch Schwermetalleinfluss innerhalb dieser Pilzgemeinschaften auftraten. Nur zwischen den Ackerböden auf der einen und den Naturböden auf der anderen Seite waren die Unterschiede gesichert. Diese Tatsache ergab sich insbesondere aus dem Dendrogramm der Abbildung 18, das auf den relativen *CFU* der Tabellen 27 und 28 basiert. Deutlich waren im Dendrogramm nur die Ackerböden von den Naturböden getrennt, wahrscheinlich bedingt durch den großen Unterschied im Boden-pH. Auffallend war auch, dass nur bei zwei der vier untersuchten Böden (Acker b u. Wald ub) alle drei Stichproben als Triplett vorlagen, ein Anzeichen für relativ starke Veränderungen innerhalb der anderen Pilzgemeinschaften zwischen den Probenahmezeitpunkten. Insbesondere innerhalb des wenig belasteten Ackerbodens war der Index der katabolischen Vielseitigkeit$_{CFU}$ (1,80 ± 0,25) größeren Schwankungen unterworfen als der Index des belasteten Ackerbodens (1,93 ± 0,05). Auch hier ließe sich durch weitere Versuche eventuell ein Zusammenhang zwischen der Anpassungsfähigkeit an Störungen und dem Variationskoeffizienten der katabolischen Vielseitigkeit$_{CFU}$ bestätigen. Warum nicht alle Böden im Dendrogramm der Abbildung 18 als Tripletts erschienen, lässt sich wegen der zu geringen Stichprobenzahl nicht beantworten.

Die Auswertung substratspezifischer Veränderungen erfolgte durch Vergleich der relativen Häufigkeiten, mit der die 21 aromatischen Säuren von den Pilzen als alleinige C-Quelle genutzt werden konnten (Tab. 27 u. 28). Bei Berücksichtigung der jeweiligen Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen ließen sich für die beiden Ackerböden relative Zunahmen der Fähigkeiten zum Abbau von 3-Hydroxybenzoat, Phenylalanin und Gentisat sowie die relative Abnahme der Fähigkeit zur Nutzung von Veratrat errechnen. Aufgrund experimenteller Erfahrungen mit Bakterien (Reber, 1973; 1975; Wenderoth und Reber, 1999 a) können die drei erstgenannten Verbindungen eher als leicht, Veratrat dagegen eher als schwer abbaubar angesehen werden. Diese Veränderungen würden daher den Erwartungen entsprechen. Bei einem stringenteren Vergleich der Ergebnisse, d.h. bei Betrachtung von Proben gleicher Entnahmezeitpunkte unter Berücksichtigung des durch Streuung der *CFU* bedingten Messfehlers, sind Unterschiede in den substratspezifischen Vermehrungseinheiten zwischen den Ackerböden dagegen nicht zu sichern.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt man bei einem Vergleich der beiden Naturböden. Die Betrachtung nur der Mittelwerte und ihrer Standardabweichung würde auf eine relative Zunahme der Fähigkeit zur Nutzung von 3-Hydroxybenzoat und eine relative Abnahme der Fähigkeiten zum Abbau von 2-Hydroxybenzoat, 2-Aminobenzoat, Veratrat und 4-Methoxycinnamat hindeuten, während der Vergleich von Proben gleicher Entnahmezeit nur eine gesicherte Abnahme der Fähigkeit zur Nutzung von 4-Methoxycinnamat anzeigt. Hier ist allerdings darauf hinzuweisen, dass diese Substanz von den Pilzen des Haldenbodens überhaupt nicht genutzt wurde. Zusammenfassend lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutige Aussage hinsichtlich des Einflusses von Schwermetallstress auf die katabolische Vielseitigkeit$_{CFU}$ von Bodenpilzen treffen, wenn einzelne Daten auch zu entsprechenden Spekulationen Anlass geben. Wie aufgrund von Daten mit Penicillien (Tab. 32 u. 33) zu vermuten ist, würden solche Veränderungen wahrscheinlich auch nur die Gemeinschaftsebene betreffen, d.h. durch Veränderungen der Artenzusammensetzung zustande kommen, nicht aber die Artebene.

Im Gegensatz zur *CFU*-Methode zeigte die Anwendung der Respirometriemethode hinsichtlich des Einflusses von Schwermetallen auf die katabolische Vielseitigkeit der Böden (berechnet aus den Kehrwerten aromatenspezifischer Abbauzeiten) signifikante Unterschiede sowohl zwischen als auch innerhalb der beiden untersuchten Bodenpaare auf (Tab. 29 u. 30). Es ergab sich, dass der Vielseitigkeitsindex im belasteten Ackerboden um 12,6 %, im belasteten Haldenboden sogar um 22,3 % gegenüber den jeweiligen Kontrollen abnahm. Die Abnahme der Gleichmäßigkeit der Verteilung relativer Abbauzeiten (*evenness*) war zwar geringer, aber ebenfalls signifikant. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den beiden Bodenpaaren ergibt sich aus der Tatsache, dass die katabolische Vielseitigkeit des gestressten Ackerbodens (1,53 ± 0,06) größer war als die des ungestressten Waldbodens (1,30 ± 0,03). Veränderungen auf der Substratseite waren, im Gegensatz zu der *CFU*-Methode, überwiegend signifikant. Auffallend war allerdings, dass einige Substrate, die sich in Reinkulturversuchen als gute C-Quellen erwiesen hatten (Reber und Wenderoth, 1997) und deshalb bei Stress hätten stärker genutzt werden müssen, nicht entsprechend reagierten. Als Beispiele seien 4-Hydroxybenzoat, Phenylalanin und Benzoat genannt, die im Acker b gegenüber Acker wb abnahmen. Nicht zu verstehen ist auch die Nichtnutzung des leicht abbaubaren Gentisat im wenig belasteten Acker und in den beiden Naturböden.

Das ebenfalls auf den Respirometriedaten beruhende Dendrogramm in der Abbildung 19 zeigt, dass bis auf den Haldenboden die drei Stichproben eines Bodens jeweils als Triplett dargestellt wurden, also eine sehr hohe Ähnlichkeit untereinander aufwiesen. Während bei der *CFU*-Methode (Abb. 18) zwei Hauptcluster deutlich zu erkennen waren, fielen die Respiro-

metriedaten in vier erkennbare Cluster. Aus der Stellung der Tripletts zueinander lässt sich eventuell sogar die kombinierte Wirkung der beiden Stressoren, d.h. einer hohen Konzentration von Protonen und Schwermetallen, ablesen. Während links der wenig belastete, wenig saure (pH ~ 6) Ackerboden steht, folgen nach rechts der unbelastete aber saure (pH ~ 3,4) Waldboden, der belastete, wenig saure (pH ~ 6) Ackerboden und der belastete, saure (pH ~ 3,4) Haldenboden. Nach dieser Einteilung wäre den Schwermetallen eine höhere ökophysiologische Wirksamkeit zuzuordnen als dem geringen pH-Wert des Bodens. Die erkennbare Trennung der schwermetallbelasteten von den wenig oder nicht belasteten Böden durch die Respirometerdaten ist insofern verständlich, als bei dieser Methode die Schwermetalle voll wirksam blieben, während sie bei der *CFU*-Methode durch die Herstellung von Bodensuspensionen weitgehend ausgedünnt wurden. Die *CFU*-Methode weist somit eher auf Unterschiede hin, die auf der Organismenebene entstanden, während die Respirometriemethode die Qualität des Habitats anzeigt. Nimmt man aufgrund der substratspezifischen *CFU* einerseits an, dass es auf der Gemeinschaftsebene der Pilze zu keiner Veränderung in der Verteilung katabolischer Fähigkeiten kommt, so muss man aus den Respirometriedaten schließen, dass die beobachteten Veränderungen von Abbauzeiten nur auf der unterschiedlichen Hemmung katabolischer Enzyme durch die beiden Stressoren beruhen können. Für die Reaktionsfähigkeit eines Bodens ist es allerdings unerheblich, ob dauerhafte Veränderungen auf einem tatsächlichen Verlust katabolischer Fähigkeiten oder nur auf der Hemmung von Enzymaktivitäten beruhen.

4.3 Wirkung der Bodenbelastung auf Wuchsleistung und katabolische Vielseitigkeit von Bodenpilzen auf der Artebene

Die in der Tabelle 31 dargestellten Ergebnisse der Wachstumsanalyse von drei Arten der Gattung *Penicillium* zeigen, dass die Schwermetallbelastung des Bodens weder bei *P. nigricans* noch bei *P. fellutanum* zu einer erheblichen phänotypischen Veränderung führte. Die Art *P. frequentans* wurde in diese Untersuchungen mit aufgenommen, obwohl sie nur aus unbelastetem Waldboden isoliert wurde. Sie ist wie *P. fellutanum* monoverticillat und wurde daher anfänglich mit diesem verwechselt. Die Tabelle 31 zeigt, dass die drei Pilze fast gleiche Wuchsraten aufwiesen, unabhängig davon, aus welchem Boden sie stammten. Die jeweils geringfügig höhere Wuchsleistung von *P. nigricans* und *P. fellutanum* aus den belasteten Böden ist statistisch nicht gesichert.

Auch ein gesicherter Einfluss der Bodenbelastung mit Schwermetallen auf die katabolische Vielseitigkeit von *P. nigricans* und *P. fellutanum* gegenüber aromatischen Säuren konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. 32). Dagegen können Unterschiede in der Nutzung von Polymeren nicht ausgeschlossen werden. Während bei *P. nigricans* aus Ackerböden eine geringe Steigerung der Nutzung der Polysaccharide Gellan, Rhamsan und Xanthan auftrat, wurde bei *P. fellutanum* aus Haldenboden zumindest eine beträchtlich geringere Nutzung von Chitin und Tannin gegenüber den Isolaten aus Waldboden festgestellt (Tab. 33). Da diese beiden Böden aber etwa 100 km voneinander entfernt sind, können die Unterschiede bei diesem Pilz nicht unbedingt auf die Schwermetallwirkung im Haldenboden zurückgeführt werden. Obwohl auf gleichen Pflanzenbewuchs geachtet wurde, könnten sie auch darauf beruhen, dass an den beiden Standorten ein unterschiedliches Angebot von C-Quellen vorlag. Erst wenn sich ein Verlust von Fähigkeiten in zwei benachbarten Böden, wie den beiden Ackerböden, nachweisen ließe, könnte er eindeutig mit der Toxizität der Schwermetalle in Verbindung gebracht werden. Dies war bei verschiedenen Bakterienarten beobachtet worden (Wenderoth et al., 2001) und wurde schon im Zusammenhang mit der Überlebensstrategie von Bakterien und Pilzen diskutiert. Vorbehaltlich der Untersuchung weiterer Arten, auch aus anderen Gattungen, kann bisher also nicht auf eine Abnahme der katabolischen Vielseitigkeit bei Pilzen auf der Artebene geschlossen werden.

4.4 Energetische Betrachtungen zu Überlebensstrategie und Diversität von Pilzen unter dem Einfluss von Schwermetallen

Nach Odum (1985) sind Gemeinschaften von Mikroorganismen besonders stressempfindlich, wenn die Diversität vor der Stresseinwirkung relativ hoch war. Atlas (1984) begründete das Entstehen einer hohen Diversität und *evenness* der Artenverteilung mit der starken Konkurrenz zwischen den Arten. Sie werde bei Stress aufgehoben mit der Folge, dass sich einzelne Arten auf Kosten der anderen verstärkt vermehren könnten. Dagegen vermuteten Wenderoth und Reber (1999 a; 1999 b) aufgrund gleichzeitiger Untersuchungen zu Diversität und katabolischer Vielseitigkeit von Bakterien, dass der Grad der Diversität u.a. einen bioenergetischen Hintergrund haben muss. Bestimmend für das Überleben unter Stress und damit auch für die Diversität von Mikroorganismengemeinschaften sei vielmehr, wie jede Art bzw. sogar jeder Stamm mit der gegebenen energetischen Situation auskommt. Während sich bei

Bakterien unter Stress Stämme mit einer geringeren katabolischen Vielseitigkeit anreichern, also ein “Verlust“ von Fähigkeiten zur Nutzung energetisch wenig profitabler C-Quellen zu beobachten ist (Wenderoth et al., 2001), reagieren Pilze auf Dauerstress durch Schwermetalle offensichtlich mit einem Mechanismus, der den Energieaufwand für die Stressbewältigung herabsetzt. In der Literatur (Hamer, 1986; Mehra und Winge, 1991; Nielson et al., 1985) wird behauptet, die Fähigkeit zur Bildung von Metallothioneinen sei ein weit verbreiteter Mechanismus zur Abwehr von Schwermetallstress. Wenn bei den eigenen Versuchen die Synthese von Metallothioneinen auch nur durch eine erhöhte Konzentration von SH-Gruppen im Protein nachgewiesen wurde, so lässt diese Mehrsynthese in zwei Isolaten von *P. fellutanum* aus unbelastetem Waldboden bei Wachstum in kupferhaltigem Medium vermuten, dass es sich dabei um eine konstitutive Schutzfunktion handelt. Die Synthese von SH-Gruppen muss aber ein sehr energieaufwändiger Mechanismus sein, da sie mit einer starken Mindersynthese von Biomasse in schwermetallhaltigem Medium verbunden ist (im Mittel 70 % bei 1 mM Cu^{2+}; Tab. 35). Tatsächlich erfordert die Mehrsynthese von SH-Gruppen durch Reduktion des Schwefels im Sulfation zusätzliche Reduktionsäquivalente, die dem Organismus für die Synthese von Biomasse fehlen, falls im Medium nicht genügend Verbindungen mit reduziertem Schwefel (Methionin, Cystein, Glutathion) zur Verfügung stehen. Bei den beiden Isolaten von *P. fellutanum* aus belastetem Haldenboden wurde weder der starke Abfall der Biomassebildung (im Mittel nur 17 % bei 1 mM Cu^{2+}) noch eine Mehrsynthese von SH-Gruppen gemessen. Diese beiden Isolate müssen also einen Mechanismus besitzen, der die energetisch teure Biosynthese von SH-Gruppen bei Wachstum in Gegenwart von Schwermetallen reprimiert. Um welchen Mechanismus es sich dabei handelt, war hier nicht Gegenstand der Untersuchungen. Denkbar ist eine geänderte Permeabilität der Zellwand für Schwermetalle oder ihre extrazelluläre Chelatisierung bzw. Präzipitation durch sekretierte Metabolite (Cervantes und Gutierrez-Corona, 1994; Tomsett, 1993). Die Beziehung zwischen Biomasse und dem SH zu Protein-Verhältnis, jeweils bezogen auf die ungestresste Variante, ist in der Abbildung 30 dargestellt.

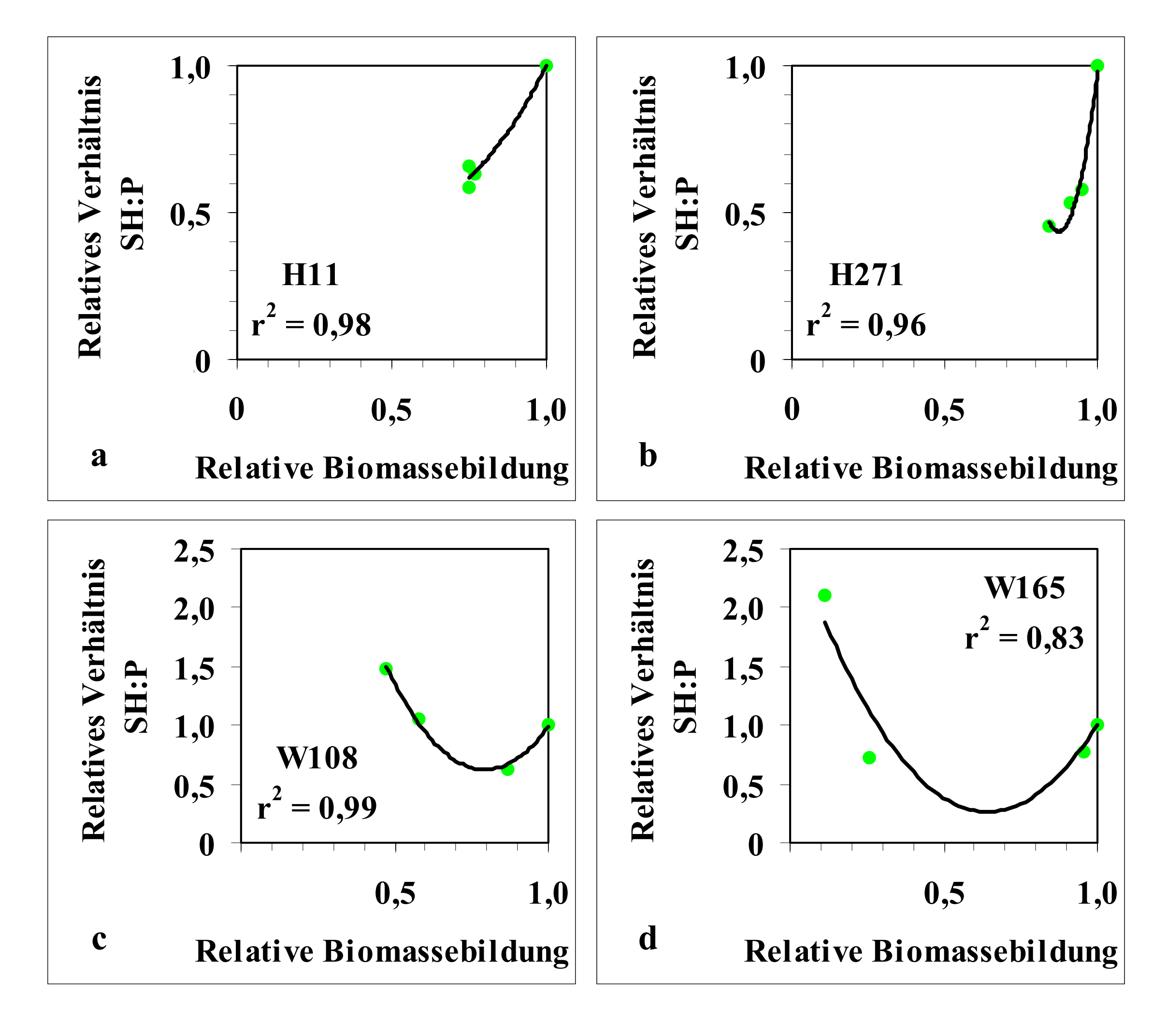


Abb. 30: Korrelation zwischen relativer Biomassebildung und relativem Verhältnis von Sulfhydrylgruppen zu Protein (SH:P) in kupferbelasteter Flüssigkultur bei Isolaten von *Penicillium fellutanum* aus Haldenboden (H; a u. b) und Waldboden (W; c u. d). Kupfer wurde in den Konzentrationen 0, 0,5, 1 u. 1,5 mM (Isolate aus Haldenboden) bzw. 0, 0,33, 0,67 u. 1 mM (Isolate aus Waldboden) appliziert. Nur bei den Isolaten aus Waldboden (W) geht das relative Verhältnis von SH:P mit zunehmender Kupferkontamination über einen Wert von 1 hinaus.

Aufgrund dieser Messungen scheint die oben angesprochene Hypothese von Atlas (1984) schon deshalb als wenig stichhaltig, weil durch den in der Natur vorherrschenden Wechsel der Bedingungen (Verfügbarkeit von C- und Energiequellen, Temperatur und Feuchtigkeit, Fressfeinde und Parasiten) einmal die eine, dann die andere Gruppe von Organismen relativ im Vorteil ist. Bei konstanten Bedingungen würden die meisten Organismen mit ähnlichen Ansprüchen bzw. Fähigkeiten aus einem Habitat verschwinden (Verlust von Redundanz). Konkurrenz zwischen Arten kann daher nicht als Ursache für die Diversität von Mikroorganismengemeinschaften angesehen werden. Vielmehr scheint sie, wie die Redun-

danz oder die Diversität, eine Folge der natürlichen Oszillation der Umweltbedingungen zu sein.

Die simultane Bestimmung von Biomassereduktion und Repression der Biosynthese von SH-Gruppen in Kulturen von *Penicillium fellutanum* unter Schwermetalleinfluss ermöglicht es, eine sinnvolle Unterscheidung zwischen den beiden Begriffen Toleranz und Resistenz zu treffen, die in der Literatur häufig nicht präzise verwendet werden (Gadd, 1986 b; 1989). Da der Erwerb der Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotika als Resistenz bezeichnet wird, könnte man die unter Schwermetallstress erworbene Fähigkeit zur Repression der Mehrsynthese von SH-Gruppen ebenfalls als Resistenz bezeichnen. Die offensichtlich konstitutive Fähigkeit zur Steigerung der Synthese von SH-Gruppen (Metallothioneinen) in kontaminierten Medien bei Pilzen, die vor der Isolierung und Kultivierung keinem permanenten Schwermetallstress ausgesetzt waren und folglich keine Resistenz erwerben konnten, müsste folglich als Toleranz bezeichnet werden. Um diese These zu untermauern, wäre allerdings zu untersuchen, ob andere Pilze ähnlich reagieren wie *P. fellutanum*.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob bei schwermetallgestressten Bodenpilzen ein Zusammenhang zwischen Stresstoleranz, Diversität und katabolischer Vielseitigkeit besteht und wie dieser eventuell zu deuten wäre. Die Untersuchungen wurden durch die Beobachtung angeregt, dass Bakterien unter Schwermetallstress Fähigkeiten zum Abbau energetisch schwer abbaubarer aromatischer Säuren "verlieren" und dadurch besser überleben können. Dies wurde als ein Toleranzmechanismus aufgefasst. Es ergab sich daher die Frage, ob Pilze unter dem Einfluss von Schwermetallen eine ähnliche Überlebensstrategie verfolgen oder andere Mechanismen der Toleranz bzw. Resistenz besitzen.

Zur Beantwortung der obigen Frage wurden vier Pilzgemeinschaften aus unterschiedlich stark kontaminierten Böden untersucht. Bodenpaar I (Ackerböden, pH ~ 6) bestand aus den am geringsten und am höchsten mit Schwermetallen (Cu, Zn, Ni u. Cd) belasteten Varianten eines Klärschlammversuchs (Gesamtbelastung 70 mg kg^{-1} bzw. 469 mg kg^{-1}), Bodenpaar II (Naturböden, pH ~ 3,4) enthielt einen unbelasteten Wald- und einen belasteten Haldenboden (Cu, Zn, Ni, Cd u. Pb; Gesamtbelastung 17 mg kg^{-1} bzw. 3271 mg kg^{-1}). Die Untersuchungen fanden sowohl auf Gemeinschafts- als auch auf Artebene statt.

Zur Abschätzung der strukturellen Diversität der Pilzgemeinschaften in den Testböden wurde ein computergestütztes kombiniertes Verfahren aus Bild- und Clusteranalyse entwickelt, mit dessen Hilfe ca. 400 Pilzisolate je Boden hinsichtlich Wachstum und Farben vermessen und Isolate gleichen Bildtyps nach Auswertung der Bilddaten gruppiert wurden. Vorteile dieser Methode sind: relative Schnelligkeit, eine hohe Reproduzierbarkeit bei konstanten Inkubations- und Messbedingungen, Anwendbarkeit ohne Artenkenntnis sowie zeitliche Trennung von Bildaufnahme und Bildanalyse. Die Diversität wurde als Zahl der Bildtypen in 125 Isolaten angegeben. Daneben wurde ein Bildanalyseverfahren entwickelt, das es ermöglichte, den Einfluss von Schwermetallen auf die relative Biomasse auf festen Nährböden wachsender Pilze durch simultane Bestimmung von Koloniefläche und -dichte aufzuzeigen.

Die Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit von Pilzgemeinschaften, ein Index für die Gleichmäßigkeit der Verteilung von Abbaufähigkeiten, erfolgte auf zwei Arten: durch Quantifizierung aromatenspezifischer Vermehrungseinheiten (*CFU*) und durch respirometrische Bestimmung aromatenspezifischer Abbauzeiten in Bodenproben. Die katabolische Vielseitigkeit von Pilzisolaten ergab sich dagegen aus dem Verhältnis aus genutzten zu angebotenen Substraten (aromatische Säuren u. Polymere).

Die Unterscheidung zwischen Toleranz und Resistenz gegenüber Schwermetallen bei Pilzisolaten erfolgte durch simultane Bestimmung der Biomasse und des Verhältnisses von Sulfhydryl (SH)-Gruppen zu Protein (P) in kupferkontaminierten Flüssigkulturen. Die oben erwähnten Untersuchungen führten zu folgenden Erkenntnissen:

- Der Einfluss von Schwermetallstress auf die Wuchsleistung von Bodenpilzen führte nur bei Isolaten aus Ackerböden zu einer signifikanten Abnahme des mittleren Durchschnittswerts und des Variationskoeffizienten. Nur der wenig belastete Ackerboden war von allen Böden unterschieden. Bei Vergleich der beiden Bodenpaare hinsichtlich ihrer Pilzdiversität waren Unterschiede nur zwischen Wald und Halde gesichert, wenn gleiche Probenahmezeitpunkte betrachtet wurden. Unterschiede zwischen den Ackerböden waren dagegen nicht signifikant.

- Die Abschätzung der katabolischen Vielseitigkeit aus der Verteilung koloniebildender Einheiten (*CFU*) zeigte, dass Schwermetalle in dieser Hinsicht wirkungslos waren. Dies galt sowohl für die Gemeinschaftsebene als auch für die Artebene (Penicillien). Unterschiede bestanden aber zwischen den beiden Bodenpaaren. Auf der Bodenebene waren, aufgrund spezifischer Verzögerungen in der Veratmung von aromatischen Säuren, deutliche Unterschiede zwischen den vier Pilzgemeinschaften zu erkennen. Grund hierfür ist die fortdauernde Wirksamkeit hoher Protonen- und Schwermetallkonzentrationen.

- Eine Kontamination von Nährboden mit Kupfer führte bei Isolaten von *P. fellutanum* aus unbelastetem Waldboden zu einer stärkeren Reduktion von Wuchsleistung und Koloniedichte und damit der relativen Biomasse als bei Isolaten aus belastetem Haldenboden.

- Biochemisch konnte nachgewiesen werden, dass die Isolate aus unbelastetem Waldboden bei Gegenwart von Cu^{2+}-Ionen ein höheres SH:P-Verhältnis aufwiesen als Isolate aus belastetem Haldenboden. Die Mehrsynthese von SH-Gruppen wurde als Bildung von Metallothioneinen verstanden, durch die Pilze eingedrungene Schwermetalle detoxifizieren können. Starke Reduktion der Biomassebildung und gleichzeitige Mehrsynthese energetisch teurer SH-Gruppen bei Isolaten von *P. fellutanum* aus Waldboden sowie geringe Biomassereduktion in Verbindung mit einer Repression der SH-Gruppensynthese bei Isolaten aus Haldenboden unter Stressbedingungen ermöglichte die Unterscheidung der Begriffe Toleranz und Resistenz. Während alle Pilze durch ihre Fähigkeit zur Bildung von SH-Gruppen eine konstitutive Toleranz gegenüber Schwermetallen besitzen, muss die Repression dieser Fähigkeit in Gegenwart von Schwermetallen als Resistenz bezeichnet werden.

6. Literaturverzeichnis

Alexander, M. 1997. Microbial communities and interactions: a prelude. In: *Manual of Environmental Microbiology* (Hurst, CJ; Knudsen, GR; McInerney, MJ; Stetzenbach, LD und Walter, MV, Hrsg), ASM Press, Washington DC, 5-13.

Anderson, TH. 1994. Physiological analysis of microbial communities in soil: Applications and limitations. In: *Beyond the biomass* (Ritz, K; Dighton, J; Giller, KE, Hrsg), John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, *British Society of Soil Science (BSSS)*, 67-76.

Anderson, JPE; Domsch, KH. 1975. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Canadian Journal of Microbiology* **21**, 314-322.

Anderson, JPE; Domsch, KH. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **10**, 215-221.

Anderson, TH; Domsch, KH. 1990. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry* **22**, 251-255.

Anderson, TH; Domsch, KH. 1993. The metabolic quotient for CO_2, (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 393-395.

Anderson, TH; Domsch, KH. 1994. Stoffwechselkoeffizienten mikrobieller Sekundärproduzenten – Verhalten und Entwicklung der mikrobiellen Biomasse in Waldstandorten. In: *Stabilitätsbedingungen von Waldökosystemen*, Teil B. Berichte des Forschungszentrums für Waldökosysteme, Göttingen, Reihe B **37**, 146-156.

Andrews, JH. 1984. Relevance of r- and K- theory to the ecology of plant pathogens. In: *Current perspectives in microbial ecology* (Klug, MJ; Reddy, CA, Hrsg), American Society of Microbiology, Washington DC, 1-7.

Arnebrant, K; Bååth, E; Nordgren, A. 1987. Copper tolerance of microfungi isolated from polluted and unpolluted forest soil. *Mycologia* **79**, 890-895.

Atlas, RM. 1984. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: *Current perspectives in microbial ecology* (Klug, MJ; Reddy, CA, Hrsg), American Society of Microbiology, Washington DC, 540-545.

Baldrian, P. 2000. Effect of heavy metals on the growth and biodegradative abilities of wood-rotting fungi. PhD Thesis, *Charles University*, Prague.

Barkay, T; Tripp, SC; Olson, BH. 1985. Effect of metal-rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 333-337.

Beneke, T; Schwippert, W. 1999. *WinSTAT®* für *Excel*, Benutzerhandbuch.

Birch, HF. 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil* **10**, 9-31.

Bjørnsen, PK. 1986. Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 1199-1204.

Blackburn, N; Hagström, Å; Wikner, J; Cuadros-Hansson, R; Bjørnsen, PK. 1998. Rapid determination of bacterial abundance, biovolume, morphology, and growth by neural network-based image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3246-3255.

Blagodatskaya, EV; Anderson, TH. 1998. Interactive effects of pH and substrate quality on the fungal-to-bacterial ratio and qCO_2 of microbial communities in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 1269-1274.

Bowater, RP; Rosche, WA; Jaworski, A; Sinden, RR; Wells, RD. 1996. Relationship between *Escherichia coli* growth and deletions of CTGCAG repeats in plasmids. *Journal of Molecular Biology* **264**, 82-96.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive procedure for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Brookes, PC; McGrath, SP. 1984. Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *The Journal of Soil Science* **35**, 341-346.

Brookes, PC; Heijnen, CE; McGrath, SP; Vance, ED. 1986. Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry* **18** (4), 383-388.

Brown, MT; Hall, IR. 1989. Metal tolerance in fungi. In: *Heavy Metal Tolerance in Plants-Evolutionary Aspects* (Shaw, AJ, Hrsg), CRC Press, Orlando FL, 95-104.

Burges, A. 1939. Soil fungi and root infection. *Broteria* **8** (35), fasc 2.

Burkhardt, C; Insam, H; Hutchinson, TC; Reber, HH. 1993. Impact of heavy metals on the degradative capabilities of soil bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils* **16**, 154-156.

Buxton, EW. 1954. Heterocaryosis and variability in *Fusarium oxysporum* f. *gladioli*. *Journal of General Microbiology* **10**, 71-84.

Cervantes, C; Gutierrez-Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **14**, 121-138.

Chander, K; Brookes, PC. 1991. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam U.K. soil. *Soil Biology and Biochemistry* **23** (10), 927-932.

Chander, K; Brookes, PC. 1993. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* **25** (9), 1231-1239.

Chaudri, AM; McGrath, SP; Giller, KE; Rietz, E; Sauerbeck, DR. 1993. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 301-309.

Colin, TS. 1996. Agar plate colony counting and size determination. Application note, Product: *SigmaScan Pro, Labtronics Inc., Jandel scientific software*.

Colin, TS. 1997. Colony counting and size determination. Application note, Product: *Mocha Video Analysis System, Labtronics Inc*.

Cooke, RC; Whipps, JM. 1993. Ecophysiology of fungi. *Blackwell Scientific Publications*, 16-18.

Coughtrey, PJ; Jones, CH; Shales, SW. 1979. Litter accumulation in woodlands contaminated by Pb, Zn, Cd and Cu. *Oecologia* **39,** 51-60.

Crowley, PH. 1992. Resampling methods for computation-intensive data analysis in ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **23,** 405-447.

Dean-Ross, D; Mills, AL. 1989. Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2002-2009.

Degens, BP. 1998. Microbial functional diversity can be influenced by the addition of simple organic substrates to soil. *Soil Biology and Biochemistry* **30** (14), 1981-1988.

Degens, BP; Harris, JA. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **29** (9-10), 1309-1320.

Degens, BP; Schipper, LA; Sparling, GP; Vojvodic-Vukovic, M. 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **32** (2), 189-196.

Degens, BP; Schipper, LA; Sparling, GP; Duncan, LC. 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistent to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1143-1153.

Domsch, KH; Gams, W; Anderson, TH. 1993. Compendium of Soil Fungi. Reprint, Vol. 1. IHW-Verlag, D-85386 Eching.

Dubuisson, MP; Jain, AK; Jain, MK. 1994. Segmentation and classification of bacterial culture images. *Journal of Microbiological Methods* **19**, 279-295.

Duxburry, T; Bicknell, B. 1983. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry* **15**, 243-250.

Ecker, DJ; Butt, TR; Sternberg, EJ; Neeper, MP; Debouck, C; Gorman, JA; Crooke, ST. 1986. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 16895-16900.

Ellman, GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**, 70-77.

Fließbach, A; Martens, R; Reber, HH. 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* **26** (9), 1201-1205.

Flury, B; Riedwyl, H. 1983. Angewandte multivariate Statistik. Computergestützte Analyse mehrdimensionaler Daten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Gadd, GM. 1986 a. The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. In*: Immobilisation of Ions by Biosorption* (Eccles, H; Hunt, S, Hrsg), Ellis Horwood, Chichester, 135-147.

Gadd, GM. 1986 b. Fungal responses towards heavy metals. In: *Microbes in Extreme Environments* (Herbert, RA; Codd, GA, Hrsg), Academic Press, London, 85-110.

Gadd, GM. 1989. Metal tolerance. In: *Microbiology of Extreme Environments* (Edwards, C, Hrsg), Open University Press, Milton Keynes, 178-210.

Gadgil, M; Solbrig, OT. 1972. The concept of r- and K-selection: evidence from wild flowers and some theoretical considerations. *American Naturalist* **106**, 14-31.

Garrett, SD. 1951. Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationships. *New Phytologist* **50**, 149-166.

Gisi, U. 1990. Bodenökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Gottwald, S; Germeier, C; Ruhmann, W; Lorch, HJ; Ottow, JCG. 1996. Einsatz der digitalen Bildanalyse für die Bestimmung von *Fusarium* spp. 50. Deutsche Pflanzenschutztagung. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* **321**, 352.

Griffin, DM. 1972. Ecology of soil fungi. Chapman and Hall, London.

Grime, JP. 1979. Plant strategies and vegetation processes. J Wiley, Chichester, New Nork, Brisbane & Toronto.

Gupta, UC. 1967. Carbohydrates. In: *Soil Biochemistry* (McLaren, AD; Petersen, GF, Hrsg), Marcel Dekker, New York, 91-118.

Hamer, DH. 1986. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 913-951.

Heinemeyer, O; Insam, H; Kaiser, EA; Walenzik, G. 1989. Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and Soil* **116**, 191-195.

Hoffmann, GM. 1964. Untersuchungen über die Kernverhältnisse bei *Fusarium oxysporum* f. *callistephi*. *Archiv für Mikrobiologie* **49**, 51-63.

Jenkinson, DS. 1966. Studies on the decomposition of plant material in soil. II. Partial sterilization of soil and the soil biomass. *Journal of Soil Science* **17**, 280-302.

Jordan, MJ; Lechevalier, MP. 1975. Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. *Canadian Journal of Microbiology* **21**, 1855-1865.

Kendrick, WB; Burges, NA. 1962. Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. *Nova Hedwigia* **4**, 313-432.

Kjøller, A; Struwe, S. 1996. Microbial diversity and its relationship to decomposition processes. In: *Functional implications of biodiversity in soil*. Ecosystems research report No **24**, 73-85.

Lindenbein, W. 1952. Über einige chemisch interessante Aktinomycetenstämme und ihre Klassifizierung. *Archiv für Mikrobiologie* **17**, 361-383.

Liu, J; Dazzo, FB; Glagoleva, O; Yu, B; Jain, AK. 2001. *CMEIAS*: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. *Microbial Ecology* **41**, 173-194.

MacArthur, RH; Wilson, EO. 1967. The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Martin, JP. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science* **69**, 215-232.

Mehra, RK; Winge, DR. 1991. Metal ion resistance in fungi-molecular mechanisms and their regulated expression. *Journal of Cellular Biochemistry* **45**, 30-40.

Mehra, RK; Tarbet, EB; Gray, WR; Winge, DR. 1988. Metal-specific synthesis of two metallothioneins and γ–glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**, 8815-8819.

Meijer, BC; Kootstra, GJ; Wilkinson, MHF. 1990. A theoretical and practical investigation into the characterization of bacterial species by image analysis. *Binary* **2**, 21-31.

Mills, AL; Colwell, RR. 1977. Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay water and sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **53**, 99-103.

Modi, RI; Wilke, CM; Rosenzweig, RF; Adams, J. 1991. Plasmid macro-evolution: selection of deletions during adaptation in a nutrient-limited environment. *Genetica* **84,** 195-202.

Møller, S; Kristensen, CS; Poulsen, LK; Carstensen, JM; Molin, S. 1995. Bacterial growth on surfaces: automated image analysis for quantification of growth rate-related parameters. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 741-748.

Munger, K; Lerch, K. 1985. Copper-metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*-chemical and spectroscopic properties. *Biochemistry* **24**, 6751-6756.

Murasugi, A; Wada, C; Hayashi, Y. 1981. Purification and unique properties in UV and CD spectra of cadmium-binding peptide I from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **103**, 1021-1028.

Newton, G; Kendrick, B. 1990. Image processing in taxonomy. *Sydowia* **42**, 246-272.

Nielson, KB; Atkin, CL; Winge, DR. 1985. Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 5342-5350.

Nordgren, A; Bååth, E; Söderström, B. 1983. Microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 1829-1837.

Nordgren, A; Bååth, E; Söderström, B. 1985. Soil microfungi in an area polluted by heavy metals. *Canadian Journal of Botany* **63**, 448-455.

Odum, EP. 1980. Grundlagen der Ökologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Odum, EP. 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *Bio Science* **35** (7), 419-422.

Ow, DW; Ortiz, DF; Speiser, DM; McCue, KF. 1994. Molecular genetic analysis of cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Metal Ions in Fungi* (Winkelmann, G; Winge, DR, Hrsg), Marcel Dekker, New York, *Mycology* **11**, 339-359.

Park, D. 1968. The ecology of terrestrial fungi. In: *The Fungi, Volume III, The Fungal Population* (Ainsworth, GC; Sussman, AS, Hrsg), Academic Press, New York and London, 5-39.

Payne, WJ. 1970. Energy yields and growth of heterotrophs. *Annual Review of Microbiology* **24**, 17-52.

Pianka, ER. 1970. On r- and K-selection. *American Naturalist* **104**, 592-597.

Pielou, EC. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* **13**, 131-144.

Pitt, JI. 1990. *PENNAME*, a new computer key to common *Penicillium* species. In: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification* (Samson, RA; Pitt, JI, Hrsg), Plenum Press, New York and London, 279-281.

Pochon, J; Tardieux, P. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle, St. Mande (Seine).

Powlson, DS. 1976. Effects of biocidal treatments on soil organisms. In: *Soil microbiology, a critical review* (Walker, N, Hrsg), Butterworths, London and Boston, 193-224.

Pugh, GJF. 1980. Strategies in fungal ecology. *Transactions of the British mycological Society* **75** (1), 1-14.

Raper, KB; Thom, C. 1949. A manual of the *Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Reber, HH. 1973. Comparative studies with two Pseudomonads on the sequential degradation of aromatic substances metabolized via different pathways. *Archiv für Mikrobiologie* **89**, 305-315.

Reber, HH. 1975. Investigation on the sequential degradation of aromatic substances in Pseudomonads. In: *Biodégradation et humification* (Kilbertus, G; Resinger, O; Mourrey, A und da Fonseca, C, Hrsg), Pierron, Sarraguémines.

Reber, HH. 1992. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils* **13**, 181-186.

Reber, HH; Wenderoth, DF. 1997. Diversität und metabolische Vielseitigkeit von Mikroorganismengemeinschaften im Boden. *Schriftenreihe des BML „Angewandte Wissenschaft“, Heft 465 „Biologische Vielfalt in Ökosystemen“*, 168-184.

Salonius, PO. 1981. Metabolic capabilities of forest soil microbial populations with reduced species diversity. *Soil Biology and Biochemistry* **13**, 1-10.

Sanders, HL. 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *American Naturalist* **102**, 243-282.

Schlegel, HG. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Schlichting, E; Blame, HP; Stahr, K. 1995. Königswasserextrakt von Böden für Mineralstoffe und Phosphor. In: *Bodenkundliches Praktikum*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien (verändert).

Schmeil, O; Fitschen, J. 1982. Flora von Deutschland und seinen angrenzenden Gebieten. Ein Buch zum Bestimmen der wildwachsenden und häufig kultivierten Gefäßpflanzen. 87. Auflage (Rauh, W; Senghas, KH, Bearb), Quelle und Meyer Verlag, Heidelberg.

Shannon, CE; Weaver, W. 1969. The mathematical theory of communication. Fourth edition. The University of Illinois Press, Urbana, Chicago, London.

Sieracki, ME; Reichenbach, SE; Webb, KL. 1989. Evaluation of automated threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2762-2772.

Simberloff, D. 1972. Properties of the rarefaction diversity measurement. *American Naturalist* **106**, 414-418.

Slocum, HK; Malmberg, M; Greco, WR; Parsons, JC; Rustum, YM. 1990. The determination of growth rates of individual colonies in agarose using high-resolution automated image analysis. *Cytometry* **11**, 793-804.

Stadelmann, FX; Santschi-Fuhrimann, E. 1987. Beitrag zur Abstützung von Schwermetall-Richtwerten im Boden mit Hilfe von Bodenatmungsmessungen. Abschlußbericht. *Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene*, Liebefeld (Schweiz).

Steinhausen, D; Langer, K. 1977. Clusteranalyse. Einführung in Methoden und Verfahren der automatischen Klassifikation. deGruyter-Lehrbuch, Berlin, New York.

Stelzer, M. 1997. Nutzung der Bildanalyse bei der Bestimmung der Diversität pilzlicher Lebensgemeinschaften. Diplomarbeit, *Technische Universität Carolo Wilhelmina,* Braunschweig.

Stelzer, M; Diedrichs, M; Reber, HH. 1999. Bestimmung der Diversität pilzlicher Lebensgemeinschaften durch Bildanalyse. Werbeschrift mit der Firma *Nikon GmbH*, Düsseldorf.

Tomori, Z; Marcin, J; Zolotová, I; Krekule, I. 1998. Interactive segmentation of biomedical images. Proc 14th Biennial International Conference „Biosignal 98“, Brno, Czech Republic, June 23-25, 1998. *SegmentTool* plug-in module for *ImageTool*. Internet site: http://www.saske.sk/~tomori/.

Tomsett, AB. 1993. Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi. In: *Stress tolerance of fungi* (Jennings, DH, Hrsg), Marcel Dekker, New York, *Mycology* **10**, 69-95.

Tyler, G. 1981. Heavy metals in soil biology and biochemistry. In: *Soil Biochemistry* **5** (Paul, EA; Ladd, JN, Hrsg), Marcel Dekker Inc, New York, Basel, 371-414.

Tyler, G; Balsberg-Pahlsson, M; Bengtsson, G; Bååth, E; Tranvik, L. 1989. Heavy metal ecology of terrestrial plants, microorganisms, and invertebrates. A review. *Water, Air and Soil Pollution* **47**, 189-216.

Ward, JH. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* **58**, 238-244.

Wenderoth, DF. 1998. Einfluss von Schwermetallstress auf die Diversität und katabolische Vielseitigkeit mikrobieller Lebensgemeinschaften im Boden. Dissertation, *Technische Universität Carolo Wilhelmina,* Braunschweig.

Wenderoth, DF; Reber, HH. 1999 a. Correlation between structural diversity and catabolic versatility of metal-affected prototrophic bacteria in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 345-352.

Wenderoth, DF; Reber, HH. 1999 b. Development and comparison of methods to estimate the catabolic versatility of metal-affected soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 1793-1802.

Wenderoth, DF; Stackebrandt, E; Reber, HH. 2001. Metal stress selects for bacterial *ARDRA*-types with a reduced catabolic versatility. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 667-670.

Wild, A. 1995. Umweltorientierte Bodenkunde. Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Wimpenny, J; Wilkinson, T; Peters, A. 1995. Monitoring microbial colony growth using image analysis techniques. In: *Binary* **7**, 14-18.

Winogradsky, S. 1924. Sur la microflore autochthone de la terre arable. *Compte rendus hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences Paris* **178**, 1236-1239.

Wood, JM. 1984. Microbiological strategies in resistance to metal ion toxicity. In: *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H, Hrsg), Marcel Dekker, New York, **18**, 333-351.

Wood, JM; Wang, HK. 1983. Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science and Technology* **17**, 582-590.

Wright, JD. 1993. Fungal degradation of benzoic acid and related compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**, 9-16.

Yamamoto, H; Tatsuyama, K; Uchiwa, T. 1985. Fungal flora of soil polluted with copper. *Soil Biology and Biochemistry* **17** (6), 785-790.

7. Anhang

7.1 Bildanalysedaten von 20 verschiedenfarbigen Pilzisolaten, die bei einem Kameraabstand von 68, 36 und 17 cm vermessen wurden

Kamera-abstand*	Pilz-Nr.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19
68 cm	P1	251	253	252	248	0	3	0,3765	0,3650	248	253	252	240	127	8	9,5558	0,6522	0,9503	0,6276	0,9312
	P2	250	252	252	245	0	4	0,4498	0,4401	176	244	201	85	138	133	12,4875	5,3999	0,1796	5,3958	0,1887
	P3	250	252	251	246	0	4	0,4939	0,4848	183	248	209	94	138	126	13,7988	5,2874	0,2521	5,2758	0,2726
	P4	240	245	243	232	0	9	1,3269	1,3117	230	250	247	194	127	39	10,0108	2,4748	0,9783	2,3855	0,9760
	P5	236	241	239	228	0	10	1,5628	1,5526	226	248	244	186	127	44	11,8997	2,8450	1,0977	2,7565	1,1033
	P6	122	121	133	113	127	34	8,0403	7,8954	199	220	215	163	132	46	17,2966	4,7117	0,8953	4,6677	0,9312
	P7	119	119	130	110	128	34	8,1827	8,0362	200	222	216	165	131	45	16,1215	4,6885	0,8856	4,6421	0,9204
	P8	116	114	126	108	84	29	7,8786	7,7876	201	225	216	162	132	48	13,8974	4,7486	0,8001	4,7059	0,8337
	P9	115	114	126	106	128	36	8,3630	8,2011	199	220	215	163	129	45	18,5026	4,6461	0,9764	4,5994	1,0126
	P10	110	108	121	103	127	35	8,4716	8,3235	200	221	216	166	127	44	18,8644	4,5738	1,1187	4,5310	1,1516
	P11	236	251	249	208	127	29	1,9258	1,8534	206	248	231	140	127	93	36,4085	3,6804	1,6537	3,6186	1,6991
	P12	221	228	227	208	0	17	2,5239	2,5041	237	251	250	213	127	27	11,0523	1,7186	1,0845	1,6521	1,0725
	P13	210	217	217	197	0	19	2,9828	2,9661	241	252	251	221	127	21	9,9942	1,3592	0,9663	1,3048	0,9555
	P14	202	209	209	189	0	22	3,2560	3,2432	245	254	254	228	127	17	5,4320	0,9932	0,5446	0,9474	0,5244
	P15	189	201	202	165	127	33	4,7308	4,7036	212	244	235	158	127	66	14,1516	4,0604	1,1205	3,9928	1,1499
	P16	184	189	193	169	127	22	4,4274	4,4139	90	135	98	39	148	195	61,3611	9,7925	3,5505	9,5515	3,3220
	P17	212	219	218	200	0	18	2,7330	2,7198	246	252	251	234	127	12	10,8356	0,9168	1,0582	0,8828	1,0418
	P18	227	231	232	216	0	13	2,2116	2,1914	247	252	251	238	127	9	11,2096	0,7622	1,1058	0,7353	1,0853
	P19	228	236	234	214	0	18	2,2203	2,1965	209	247	231	151	134	70	6,4760	4,5224	0,4413	4,4372	0,4653
	P20	244	249	247	235	0	10	1,0973	1,0742	224	252	248	174	127	58	10,6995	3,0367	1,0164	2,9450	1,0207
VK**		0,262	0,270	0,239	0,278	1,271	0,563	0,797	0,794	0,171	0,114	0,154	0,312	0,043	0,828	0,779	0,623	0,658	0,627	0,615
DW aller 19 VK		0,495 ± 0,323																		
DW der VK eigentlicher Farbparameter (F1-F4, F9-F12) = 0,225 ± 0,070																				
DW der VK der Parameter für Verteilung von Farben und Helligkeit (F5-F8, F13-F19) = 0,691 ± 0,289																				

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.
**VK = Variationskoeffizient (SD/DW), wobei SD = Standardabweichung, DW = Durchschnittswert.
Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (F1), *Mean Red* (F2), *Mean Green* (F3), *Mean Blue* (F4), *Hue Typical* (F5), *Mean Saturation* (F6), *Mean Brightness* (F7), *Mean Density* (F8).
Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (F9), *Mean Red* (F10), *Mean Green* (F11), *Mean Blue* (F12), *Hue Typical* (F13), *Mean Saturation* (F14), *Gray Variation* (F15), *Mean Brightness* (F16), *Bright Variation* (F17), *Mean Density* (F18), *Density Variation* (F19).

Kamera-abstand*	Pilz-Nr.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19
36 cm	P1	164	174	172	149	127	24	5,6482	5,6496	159	186	172	120	135	61	9,3696	5,6613	0,2221	5,6666	0,2283
	P2	174	202	179	142	145	47	5,5111	5,5044	102	157	119	33	140	175	9,3156	7,6072	0,2517	7,6076	0,2504
	P3	182	207	186	154	145	39	5,3486	5,3395	107	159	124	38	140	166	9,7824	7,4952	0,2766	7,4961	0,2734
	P4	161	181	166	138	145	37	5,9045	5,9002	140	169	152	101	139	70	10,1492	6,0422	0,4363	6,0588	0,4383
	P5	161	178	166	140	144	34	5,9706	5,9604	137	166	148	98	139	72	10,1254	6,1315	0,4645	6,1576	0,4657
	P6	63	59	73	58	123	70	11,0658	10,7678	118	133	131	92	128	57	11,7000	7,0867	0,5156	7,0951	0,5040
	P7	62	59	72	57	123	68	11,1251	10,8221	119	134	132	93	128	56	11,2431	7,0416	0,5156	7,0508	0,5035
	P8	60	56	69	56	70	56	11,1502	10,8514	119	134	131	91	130	59	9,4400	7,0794	0,4619	7,0861	0,4509
	P9	59	55	68	54	123	74	11,4338	11,1034	119	134	132	93	128	57	12,8632	7,0120	0,5752	7,0231	0,5624
	P10	57	52	65	53	90	70	11,5237	11,1900	121	136	133	93	128	57	14,1719	6,9760	0,6108	6,9847	0,6010
	P11	134	154	146	102	134	59	6,2985	6,3166	122	160	137	70	136	123	25,2043	6,8663	1,2390	6,8612	1,1949
	P12	134	141	142	120	127	29	6,7081	6,6976	150	178	164	108	135	70	8,0960	5,7857	0,1849	5,7958	0,1936
	P13	122	127	131	110	127	29	7,1890	7,1569	148	172	161	113	135	60	9,2342	5,8462	0,3297	5,8555	0,3320
	P14	122	128	130	108	127	33	7,4529	7,3945	155	181	168	117	135	62	8,1309	5,7099	0,1652	5,7176	0,1749
	P15	102	108	113	87	123	38	7,7243	7,7082	124	154	143	78	133	96	12,8487	6,8272	0,6016	6,8412	0,5896
	P16	103	106	112	92	106	28	8,0263	7,9584	59	92	64	22	139	208	43,9631	11,5489	3,4333	11,2026	3,1549
	P17	130	137	138	116	127	30	7,0800	7,0383	156	180	168	120	135	57	11,8042	5,7348	0,3513	5,7411	0,3554
	P18	143	150	151	128	127	26	6,4506	6,4392	157	182	170	120	135	58	12,1161	5,7226	0,3529	5,7290	0,3582
	P19	133	142	142	117	127	33	6,5291	6,5347	125	157	139	79	137	94	4,0201	6,9220	0,2743	6,9374	0,2512
	P20	160	176	169	138	136	36	5,8539	5,8451	135	171	151	84	137	97	9,7322	6,2373	0,4854	6,2617	0,4845
VK**		0,345	0,395	0,314	0,327	0,147	0,389	0,289	0,276	0,185	0,150	0,174	0,326	0,031	0,517	0,661	0,192	1,207	0,182	1,141
DW aller 19 VK		0,382 ± 0,314																		
DW der VK eigentlicher Farbparameter (F1-F4, F9-F12) = 0,277 ± 0,093																				
DW der VK der Parameter für Verteilung von Farben und Helligkeit (F5-F8, F13-F19) = 0,458 ± 0,396																				

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.
**VK = Variationskoeffizient (SD/DW), wobei SD = Standardabweichung, DW = Durchschnittswert.
Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (F1), *Mean Red* (F2), *Mean Green* (F3), *Mean Blue* (F4), *Hue Typical* (F5), *Mean Saturation* (F6), *Mean Brightness* (F7), *Mean Density* (F8).
Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (F9), *Mean Red* (F10), *Mean Green* (F11), *Mean Blue* (F12), *Hue Typical* (F13), *Mean Saturation* (F14), *Gray Variation* (F15), *Mean Brightness* (F16), *Bright Variation* (F17), *Mean Density* (F18), *Density Variation* (F19).

Kamera-abstand*	Pilz-Nr.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19
17 cm	P1	127	134	134	114	127	25	6,6761	6,6846	114	133	125	83	134	67	6,0303	7,3189	0,1611	7,3189	0,1607
	P2	155	181	160	125	144	50	5,8385	5,8421	100	153	115	31	140	180	9,6047	7,6981	0,2575	7,6980	0,2568
	P3	161	185	166	135	145	42	5,7265	5,7277	103	156	120	36	140	169	9,8992	7,5806	0,2732	7,5810	0,2712
	P4	140	158	145	119	145	38	6,3094	6,3133	119	145	130	85	139	73	8,0836	7,0683	0,3940	7,0820	0,3692
	P5	136	151	141	117	144	36	6,5122	6,5031	117	143	127	82	139	75	8,5621	7,1543	0,3676	7,1650	0,3460
	P6	83	80	94	76	92	51	9,8427	9,6151	108	122	121	82	128	61	11,2092	7,4153	0,4177	7,4206	0,4031
	P7	80	78	91	73	126	52	9,9979	9,7638	108	123	121	82	128	61	10,6868	7,4194	0,3946	7,4245	0,3801
	P8	77	74	87	71	74	44	10,0038	9,7861	109	124	121	82	131	62	8,8578	7,4241	0,2979	7,4272	0,2875
	P9	78	76	89	73	70	53	10,2018	9,9430	107	122	120	82	128	60	12,3444	7,4292	0,4575	7,4357	0,4412
	P10	77	74	87	71	92	50	10,1362	9,8937	109	124	122	83	128	61	13,4037	7,3437	0,5533	7,3479	0,5447
	P11	118	136	130	90	133	61	7,0457	7,0600	107	142	121	58	136	131	23,3887	7,7132	1,2993	7,6879	1,2126
	P12	119	124	127	106	127	30	7,2540	7,2230	114	136	126	80	134	75	6,6133	7,3079	0,1753	7,3080	0,1750
	P13	112	117	120	101	127	30	7,6340	7,5795	112	130	122	83	134	64	6,7515	7,3755	0,1931	7,3751	0,1909
	P14	114	119	122	101	127	34	7,8501	7,7683	113	133	124	83	135	67	6,3286	7,3418	0,1700	7,3419	0,1692
	P15	105	112	116	90	125	38	7,5927	7,5780	100	127	117	57	134	112	11,9069	7,7006	0,3662	7,6973	0,3587
	P16	107	110	116	97	106	28	7,8273	7,7722	48	79	51	15	149	221	39,4158	12,3925	3,1723	11,9781	2,9101
	P17	117	123	125	105	127	31	7,6088	7,5418	114	133	125	86	135	63	7,5726	7,3013	0,2103	7,3012	0,2085
	P18	120	125	128	108	127	27	7,2528	7,2186	113	131	124	84	133	64	7,6008	7,3460	0,2174	7,3455	0,2150
	P19	116	123	124	102	127	32	7,1034	7,0994	103	132	116	61	136	104	3,2978	7,6095	0,0866	7,6095	0,0866
	P20	126	138	135	108	134	38	6,7091	6,7133	108	139	122	64	137	104	8,6220	7,4707	0,2375	7,4708	0,2357
VK**		0,219	0,274	0,189	0,191	0,185	0,262	0,190	0,179	0,138	0,120	0,138	0,299	0,038	0,501	0,711	0,147	1,405	0,135	1,350
DW aller 19 VK		0,351 ± 0,392																		
DW der VK eigentlicher Farbparameter (F1-F4, F9-F12) = 0,196 ± 0,065																				
DW der VK der Parameter für Verteilung von Farben und Helligkeit (F5-F8, F13-F19) = 0,464 ± 0,490																				

*Abstand zwischen Frontlinse des Objektivs und der Agaroberfläche.
**VK = Variationskoeffizient (SD/DW), wobei SD = Standardabweichung, DW = Durchschnittswert.
Farbparameter der Kolonieoberseite: *Mean Gray* (F1), *Mean Red* (F2), *Mean Green* (F3), *Mean Blue* (F4), *Hue Typical* (F5), *Mean Saturation* (F6), *Mean Brightness* (F7), *Mean Density* (F8).
Farbparameter der Kolonieunterseite: *Mean Gray* (F9), *Mean Red* (F10), *Mean Green* (F11), *Mean Blue* (F12), *Hue Typical* (F13), *Mean Saturation* (F14), *Gray Variation* (F15), *Mean Brightness* (F16), *Bright Variation* (F17), *Mean Density* (F18), *Density Variation* (F19).

7.2 Bildanalysedaten von 29 Pilzstämmen bzw. -isolaten

Pilz-Nr.	[mm d^{-1}]	*M Gray* *	*M Red* *	*M Green* *	*M Blue* *	*Hue T* *	*M Saturation* *	*M Brightness* *	*M Density* *	*M Gray* **
Ao1	2,7376	84	125	93	34	143	161	8,8237	8,7345	92
Ao2	2,6023	84	125	94	35	143	159	8,7407	8,6597	93
Ao3	2,5314	83	123	93	35	142	158	8,7812	8,6981	92
An1	2,5648	66	75	71	53	0	124	11,1516	10,8249	115
An2	2,6351	65	74	70	51	0	127	11,2341	10,9016	114
An3	2,5205	64	74	69	51	0	130	11,2868	10,9491	112
Cc1	0,9798	92	112	98	67	141	71	8,4853	8,4109	72
Cc2	0,9978	92	112	98	68	141	69	8,4379	8,3679	75
Cc3	0,9689	92	112	98	68	141	70	8,4166	8,3499	72
Gs1	2,7068	104	153	112	50	144	131	7,5527	7,5528	87
Gs2	2,7467	103	151	111	49	144	132	7,5840	7,5839	88
Gs3	2,7714	103	151	111	49	144	132	7,5811	7,5810	88
Th1	12,7223	97	116	107	69	134	76	7,8950	7,8780	98
Th2	13,1435	96	116	107	67	135	79	7,9368	7,9159	98
Th3	12,8087	98	116	107	71	134	70	7,8424	7,8287	98
Af1	3,0958	74	97	86	39	134	168	10,3524	10,0961	114
Af2	3,0992	75	99	87	40	134	168	10,2745	10,0249	114
Af3	3,2698	77	101	89	41	134	164	10,0972	9,8630	114
As1	3,9541	69	93	80	35	137	152	10,2473	10,0290	57
As2	3,8844	70	93	81	37	137	149	10,2569	10,0359	53
As3	3,6395	70	93	81	37	137	150	10,2544	10,0328	55
Pn1	2,4736	105	113	112	92	134	32	7,5388	7,5391	112
Pn2	2,5146	109	118	115	94	127	34	7,4025	7,4076	111
Pn3	2,5182	105	112	112	93	127	29	7,5336	7,5336	111
Mm1	10,0864	95	123	106	58	137	98	7,8248	7,8210	96
Mm2	9,9417	95	122	105	58	137	99	7,8475	7,8435	96
Mm3	9,9960	96	123	106	59	138	97	7,8082	7,8055	97

*Oberseite der Kolonie, **Unterseite der Kolonie; *M = Mean*, *T = Typical*, *V = Variation.*

Pilz-Nr.	*M Red***	*M Green***	*M Blue***	*Hue T***	*M Saturation***	*Gray V***	*M Brightness***	*Bright V***	*M Density***	*Density V***
Ao1	132	99	47	144	135	20,7453	8,3760	1,2570	8,3136	1,1674
Ao2	133	100	48	144	135	21,6100	8,3616	1,3107	8,2986	1,2170
Ao3	132	99	47	144	136	21,8074	8,4177	1,3493	8,3505	1,2516
An1	132	122	94	137	49	16,2824	7,2612	0,9044	7,2625	0,8437
An2	130	121	93	137	49	15,2626	7,3147	0,8021	7,3136	0,7490
An3	128	118	89	137	54	20,3967	7,4642	1,2602	7,4524	1,1684
Cc1	96	79	43	141	140	40,9262	10,3729	3,2178	10,1294	2,9523
Cc2	99	81	45	141	136	41,3144	10,2323	3,1923	9,9988	2,9311
Cc3	95	79	43	141	138	40,7881	10,3936	3,2185	10,1486	2,9525
Gs1	152	86	25	143	199	21,8702	8,7208	1,3032	8,6325	1,2121
Gs2	151	89	26	143	196	21,0938	8,6375	1,2419	8,5564	1,1549
Gs3	150	88	26	143	194	21,0582	8,6741	1,2712	8,5901	1,1806
Th1	116	106	73	136	63	10,8222	7,7583	0,3279	7,7546	0,3219
Th2	116	107	74	136	63	11,8377	7,7623	0,3852	7,7561	0,3751
Th3	115	106	73	136	63	11,4842	7,7918	0,3858	7,7846	0,3745
Af1	139	122	82	139	72	9,2249	7,2372	0,4025	7,2457	0,3836
Af2	139	122	82	139	71	9,9323	7,2173	0,4371	7,2271	0,4168
Af3	139	123	81	139	72	9,9301	7,2185	0,4320	7,2283	0,4116
As1	65	62	43	135	72	48,3478	11,8518	3,5615	11,4654	3,2977
As2	61	58	41	135	74	48,6342	12,1573	3,6489	11,7457	3,3741
As3	64	60	41	135	77	48,8170	12,0163	3,6425	11,6161	3,3694
Pn1	132	121	84	137	65	12,8409	7,2601	0,5195	7,2706	0,5000
Pn2	131	119	82	137	67	13,2722	7,3190	0,4980	7,3286	0,4783
Pn3	131	120	84	137	64	11,9734	7,3132	0,4488	7,3220	0,4302
Mm1	123	106	61	138	93	5,6629	7,7844	0,1963	7,7826	0,1893
Mm2	123	106	60	138	94	4,8550	7,7860	0,1747	7,7847	0,1678
Mm3	124	107	62	138	92	4,7615	7,7511	0,1536	7,7503	0,1492

Pilz-Nr.	[mm d^{-1}]	*M Gray* *	*M Red* *	*M Green* *	*M Blue* *	*Hue T* *	*M Saturation* *	*M Brightness* *	*M Density* *	*M Gray* **
Fc1	9,1211	98	134	101	59	145	99	7,7715	7,7665	89
Fc2	8,5257	98	135	101	59	146	102	7,7525	7,7492	90
Fc3	8,6728	98	136	101	58	145	104	7,7445	7,7418	90
Pl1	1,9988	158	179	162	135	144	37	5,7892	5,7915	98
Pl2	2,0421	160	180	163	137	144	37	5,7747	5,7765	98
Pl3	2,0649	159	179	163	136	144	37	5,7793	5,7813	97
Mf1	11,4728	96	121	105	63	138	87	7,7984	7,7951	97
Mf2	11,3793	96	120	105	64	138	84	7,7937	7,7910	97
Mf3	11,5891	98	122	107	65	138	84	7,7503	7,7478	98
Hv1	1,9141	44	58	51	25	133	169	12,3770	11,9772	57
Hv2	2,1100	40	53	46	21	133	182	12,8106	12,3721	54
Hv3	2,0711	40	53	47	22	133	178	12,7447	12,3125	55
Pfu1	2,4807	161	176	166	141	141	31	5,8020	5,8026	115
Pfu2	2,4777	160	175	166	141	139	31	5,8306	5,8310	116
Pfu3	2,4657	162	177	167	143	141	30	5,7798	5,7799	114
Or1	0,8289	108	123	116	85	134	52	7,4621	7,4638	95
Or2	0,8764	112	126	120	91	134	46	7,2689	7,2759	101
Or3	1,1786	108	123	116	87	134	49	7,4066	7,4109	100
Hs1	10,0731	104	122	111	80	137	58	7,5624	7,5575	97
Hs2	9,3438	104	122	111	80	137	58	7,5895	7,5816	98
Hs3	10,7117	103	121	109	79	137	59	7,5900	7,5864	98
Vc1	1,9363	88	124	95	45	142	125	8,2110	8,1845	100
Vc2	1,8467	87	123	95	45	142	124	8,2405	8,2114	100
Vc3	1,8800	87	125	94	43	143	131	8,2644	8,2342	100
Pc1	2,2160	161	180	167	136	139	38	5,7586	5,7596	145
Pc2	2,2244	159	178	165	134	141	39	5,7821	5,7839	142
Pc3	2,2557	159	178	165	135	141	38	5,7882	5,7897	144

*Oberseite der Kolonie, **Unterseite der Kolonie; *M = Mean*, *T = Typical*, *V = Variation.*

Pilz-Nr.	*M Red* [**]	*M Green* [**]	*M Blue* [**]	*Hue T* [**]	*M Saturation* [**]	*Gray V* [**]	*M Brightness* [**]	*Bright V* [**]	*M Density* [**]	*Density V* [**]
Fc1	168	92	9	146	231	12,0618	8,2426	0,7056	8,2064	0,6553
Fc2	168	92	10	146	230	13,8022	8,2876	0,8334	8,2449	0,7730
Fc3	170	93	9	146	230	12,2800	8,2025	0,6945	8,1685	0,6464
Pl1	134	104	56	141	115	29,1565	8,2710	1,8749	8,2021	1,7390
Pl2	135	105	56	141	118	28,4691	8,2527	1,8319	8,1869	1,6973
Pl3	133	104	56	141	116	29,6160	8,3091	1,9439	8,2374	1,8003
Mf1	119	105	66	138	79	11,1810	7,7689	0,3637	7,7681	0,3542
Mf2	120	106	66	138	79	12,5250	7,7737	0,4295	7,7703	0,4155
Mf3	121	106	67	138	79	11,6825	7,7269	0,3648	7,7270	0,3571
Hv1	65	63	45	134	58	35,3000	11,4014	3,0030	11,0799	2,7462
Hv2	60	60	42	134	59	33,9070	11,6909	2,9216	11,3454	2,6704
Hv3	62	61	44	134	55	34,8556	11,5540	2,9778	11,2196	2,7227
Pfu1	156	126	64	141	117	16,9458	7,0511	0,7394	7,0646	0,7235
Pfu2	156	128	67	141	110	12,8095	7,0631	0,5922	7,0792	0,5707
Pfu3	154	125	63	141	118	14,4557	7,1545	0,6192	7,1691	0,5982
Or1	113	103	70	136	69	17,9250	8,1523	1,0987	8,1093	1,0186
Or2	119	110	76	136	66	19,4699	7,8965	1,1224	7,8654	1,0449
Or3	119	109	74	136	70	19,7570	7,9189	1,1564	7,8874	1,0766
Hs1	132	106	53	141	115	5,5326	7,7750	0,1889	7,7735	0,1826
Hs2	135	108	53	141	117	6,5191	7,7327	0,2474	7,7303	0,2365
Hs3	133	108	55	141	110	5,8398	7,7267	0,1903	7,7257	0,1846
Vc1	142	109	52	142	124	7,8855	7,6893	0,2923	7,6856	0,2806
Vc2	140	108	52	142	124	8,1654	7,7153	0,3073	7,7108	0,2949
Vc3	142	107	50	143	127	7,3749	7,7047	0,2681	7,7016	0,2580
Pc1	177	156	102	138	73	11,8126	5,9516	0,4715	5,9609	0,4712
Pc2	174	153	100	139	74	11,0008	5,9943	0,4701	6,0050	0,4694
Pc3	176	155	102	138	72	11,7189	5,9600	0,4706	5,9698	0,4704

Pilz-Nr.	$[mm\ d^{-1}]$	*M Gray* *	*M Red* *	*M Green* *	*M Blue* *	*Hue T* *	*M Saturation* *	*M Brightness* *	*M Density* *	*M Gray* **
Er1	1,2806	82	105	94	48	134	128	9,2902	9,1484	90
Er2	1,2911	81	104	93	47	134	131	9,3983	9,2469	91
Er3	1,2908	80	103	92	45	134	136	9,5240	9,3615	89
Pf a1	1,6127	124	135	130	107	134	38	7,0748	7,0479	139
Pf a2	1,5661	122	134	128	105	134	38	7,0755	7,0549	140
Pf a3	1,5484	127	140	133	110	134	37	6,8465	6,8354	139
Ch1	1,9487	48	63	57	25	134	166	12,0522	11,6805	54
Ch2	1,8373	48	63	57	26	134	163	12,0117	11,6436	50
Ch3	1,8903	48	63	56	25	134	167	12,0778	11,7039	52
Pf b1	1,5370	116	126	122	100	134	38	7,5079	7,4587	137
Pf b2	1,6327	120	131	126	105	134	36	7,2367	7,2047	140
Pf b3	1,7078	123	134	129	107	134	35	7,0844	7,0617	138
Ba1	4,5020	99	117	105	74	138	64	7,7375	7,7339	103
Ba2	5,1450	99	116	105	76	137	61	7,7609	7,7538	102
Ba3	5,1451	98	117	105	73	138	66	7,7763	7,7698	102
Pf c1	1,6091	130	142	136	115	136	31	6,6616	6,6644	141
Pf c2	1,6001	128	139	134	113	136	31	6,7876	6,7833	140
Pf c3	1,6087	128	139	134	113	134	31	6,7631	6,7609	143
Tr1	2,9921	105	135	112	70	143	84	7,5335	7,5338	112
Tr2	2,8030	105	134	112	69	143	83	7,5430	7,5434	111
Tr3	2,6448	106	134	113	72	143	79	7,5050	7,5054	114
Sb1	1,4224	152	168	158	133	141	33	6,0047	6,0063	133
Sb2	1,4150	152	168	157	131	141	35	6,0001	6,0024	130
Sb3	1,3454	155	174	160	133	141	36	5,9314	5,9326	131
Mr1	3,4279	89	122	96	51	143	113	8,2903	8,2487	101
Mr2	3,3126	88	120	94	50	143	116	8,4352	8,3813	101
Mr3	3,2593	88	121	95	49	142	119	8,4147	8,3628	102

*Oberseite der Kolonie, **Unterseite der Kolonie; *M = Mean* , *T = Typical* , *V = Variation.*

Pilz-Nr.	*M Red***	*M Green***	*M Blue***	*Hue T***	*M Saturation***	*Gray V***	*M Brightness***	*Bright V***	*M Density***	*Density V***
Er1	127	105	40	137	159	26,8932	8,7091	1,9221	8,6125	1,7703
Er2	127	104	42	137	154	26,5434	8,6698	1,8863	8,5765	1,7378
Er3	125	103	41	138	156	26,1079	8,7398	1,8954	8,6429	1,7444
Pf a1	168	150	99	137	72	9,5986	6,0474	0,4428	6,0620	0,4424
Pf a2	170	152	99	138	73	10,3231	6,0355	0,4568	6,0489	0,4566
Pf a3	170	151	99	138	73	10,2037	6,0466	0,4562	6,0610	0,4561
Ch1	57	59	48	134	63	39,7429	11,7929	3,2387	11,4318	2,9677
Ch2	53	55	43	134	69	40,8379	12,1861	3,3923	11,7908	3,1060
Ch3	55	57	45	134	65	39,4583	11,9532	3,2595	11,5792	2,9848
Pf b1	164	148	101	137	67	8,2373	6,0601	0,4086	6,0771	0,4088
Pf b2	167	150	103	137	66	8,7824	6,0184	0,4125	6,0306	0,4122
Pf b3	166	149	100	137	68	8,4566	6,0484	0,4135	6,0629	0,4131
Ba1	125	110	74	139	75	13,2802	7,7144	0,7712	7,6996	0,7165
Ba2	123	109	74	139	73	13,1221	7,7607	0,7823	7,7440	0,7262
Ba3	125	110	74	139	75	12,7541	7,7255	0,7205	7,7111	0,6705
Pf c1	168	151	106	138	62	9,4412	5,9955	0,4262	6,0066	0,4260
Pf c2	166	150	106	138	62	8,9317	6,0071	0,4138	6,0190	0,4136
Pf c3	169	152	108	138	61	9,5438	5,9702	0,4120	5,9809	0,4121
Tr1	141	119	75	142	82	6,1598	7,3679	0,1622	7,3679	0,1622
Tr2	142	119	74	142	83	5,7934	7,3695	0,1504	7,3695	0,1504
Tr3	143	121	78	142	78	6,4666	7,3094	0,1715	7,3095	0,1713
Sb1	165	144	93	139	77	9,7069	6,2979	0,5385	6,3181	0,5353
Sb2	162	141	90	139	78	9,8588	6,4617	0,5803	6,4802	0,5725
Sb3	163	142	91	139	78	9,5214	6,3627	0,5502	6,3865	0,5441
Mr1	134	111	59	139	105	6,3695	7,6505	0,1699	7,6504	0,1695
Mr2	134	112	60	139	104	6,2506	7,6331	0,1644	7,6331	0,1641
Mr3	134	112	60	139	103	5,7979	7,6240	0,1525	7,6240	0,1525

Pilz-Nr.	[mm d^{-1}]	*M Gray* *	*M Red* *	*M Green* *	*M Blue* *	*Hue T* *	*M Saturation* *	*M Brightness* *	*M Density* *	*M Gray* **
Tv1	12,3493	102	114	108	84	134	43	7,6319	7,6313	100
Tv2	12,3865	101	113	107	83	136	44	7,6606	7,6600	98
Tv3	12,1659	101	113	107	83	134	45	7,6557	7,6550	100
Sc1	0,4044	35	52	37	15	141	188	13,3258	12,8405	35
Sc2	0,4095	35	53	38	15	141	183	13,2540	12,7763	35
Sc3	0,4302	32	48	34	14	141	202	13,6716	13,1532	34
*Oberseite der Kolonie, **Unterseite der Kolonie; *M = Mean*, *T = Typical*, *V = Variation.*										

Pilz-Nr.	*M Red* **	*M Green* **	*M Blue* **	*Hue T* **	*M Saturation* **	*Gray V* **	*M Brightness* **	*Bright V* **	*M Density* **	*Density V* **
Tv1	115	107	80	136	52	6,1441	7,6596	0,1631	7,6595	0,1625
Tv2	114	105	77	136	55	7,1214	7,7161	0,1908	7,7158	0,1901
Tv3	115	107	79	136	53	5,6439	7,6755	0,1503	7,6755	0,1500
Sc1	67	35	4	151	233	12,5025	13,2080	1,2469	12,7345	1,1335
Sc2	67	35	4	151	236	12,2769	13,2515	1,2267	12,7741	1,1152
Sc3	66	34	4	151	237	12,1435	13,3114	1,2111	12,8285	1,1010

7.3 Bildanalysedaten von Pilzisolaten aus den Acker- (Bodenpaar I) und Naturböden (Bodenpaar II)

Die Bildanalysedaten von Pilzisolaten aus den Acker- und Naturböden liegen aufgrund ihres großen Umfangs nicht gedruckt vor, sondern wurden in Form von *Microsoft Word*-Dateien auf einer CD als Anlage beigefügt. Dabei sind die Dateinamen den einzelnen Bodenstichproben wie folgt zugeordnet:

Bodenstichprobe	*Microsoft Word*-Datei
Acker wb1*	Acker_wb_1.doc
Acker wb2*	Acker_wb_2.doc
Acker wb3*	Acker_wb_3.doc
Acker b1*	Acker_b_1.doc
Acker b2*	Acker_b_2.doc
Acker b3*	Acker_b_3.doc
Wald ub1*	Wald_ub_1.doc
Wald ub2*	Wald_ub_2.doc
Wald ub3*	Wald_ub_3.doc
Halde b1*	Halde_b_1.doc
Halde b2*	Halde_b_2.doc
Halde b3*	Halde_b_3.doc

*wb = wenig belastet, b = belastet, ub = unbelastet.

7.4 Substratnutzungsspektren von Isolaten der Gattung *Penicillium*

Acker wb*, Gruppe 1: *P. nigricans*, 20 Isolate.															
	Polymere: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.														
Isolat-Nr.	Xyl	Cel	Chi	Lss	Car	Par	Lec	Ker	Xan	Rha	Dex	Gel	Tan#	Tan+	Manu	Celac
2_114	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_115	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
2_127	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_230	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
2_237	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
2_239	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_281	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_287	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_288	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_292	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_297	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_306	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
2_312	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
2_313	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_314	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
2_315	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_386	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_389	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_395	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2_405	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
*wb = wenig belastet, #Hofbildung, +Wachstum.															

Acker b*, Gruppe 1: *P. nigricans*, 20 Isolate.

Polymere: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.

Isolat-Nr.	Xyl	Cel	Chi	Lss	Car	Par	Lec	Ker	Xan	Rha	Dex	Gel	Tan#	Tan+	Manu	Celac
7_179	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_181	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_184	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_185	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
7_188	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_191	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_195	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_203	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_214	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
7_215	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_220	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
7_226	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
7_227	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
7_251	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
7_252	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_257	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
7_258	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
7_261	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
7_275	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
7_276	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0

*b = belastet, #Hofbildung, +Wachstum.

Wald ub[*], Gruppe 2: *P. fellutanum*, 20 Isolate.																
	Polymere: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.															
Isolat-Nr.	Xyl	Cel	Chi	Lss	Car	Par	Lec	Ker	Xan	Rha	Dex	Gel	Tan[#]	Tan[+]	Manu	Celac
W127	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W133	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W147	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W156	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W157	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W158	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W165	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W177	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W191	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W206	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W214	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W215	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W227	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W228	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W243	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W367	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W368	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
W370	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W378	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W385	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
[*]ub = unbelastet, [#]Hofbildung, [+]Wachstum.																

Halde b[*], Gruppe 2: *P. fellutanum*, 20 Isolate.

Polymere: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.

Isolat-Nr.	Xyl	Cel	Chi	Lss	Car	Par	Lec	Ker	Xan	Rha	Dex	Gel	Tan[#]	Tan[+]	Manu	Celac
H114	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H150	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H173	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H176	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H239	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H241	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H248	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H271	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H275	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
H288	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H293	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H298	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H302	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H307	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
H320	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
H321	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H338	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H354	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H362	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
H381	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0

[*]b = belastet, [#]Hofbildung, [+]Wachstum.

Wald ub*, Gruppe 3: *P. frequentans*, 57 Isolate.																
	Polymere: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.															
Isolat-Nr.	Xyl	Cel	Chi	Lss	Car	Par	Lec	Ker	Xan	Rha	Dex	Gel	Tan#	Tan+	Manu	Celac
W136	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W142	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W143	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W145	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W151	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W159	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W160	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W162	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W166	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W173	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W184	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W185	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W189	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W194	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W198	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W202	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W211	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W216	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W217	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W219	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W225	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W230	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
W232	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W245	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W246	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W251	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
W252	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W253	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
W254	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W283	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W284	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W289	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W291	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W292	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W293	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W295	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W297	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W299	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W301	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W305	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
W313	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
*ub = unbelastet, #Hofbildung, +Wachstum.																

Wald ub[*], Gruppe 3: *P. frequentans*, 57 Isolate.																
	Polymere: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.															
Isolat-Nr.	Xyl	Cel	Chi	Lss	Car	Par	Lec	Ker	Xan	Rha	Dex	Gel	Tan[#]	Tan[+]	Manu	Celac
W316	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W317	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W319	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W320	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
W321	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
W326	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
W327	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
W328	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
W331	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
W335	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
W336	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
W337	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W340	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W344	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
W345	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
W346	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
[*]ub = unbelastet, [#]Hofbildung, [+]Wachstum.																

Acker wb[*], Gruppe 1: *P. nigricans*, 20 Isolate.

Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.

Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC[#]	4MC[+]	Anis	Phth	Ter	Nic
2_114	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_115	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_127	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_230	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_237	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_239	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_281	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_287	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_288	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_292	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_297	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_306	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_312	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_313	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_314	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_315	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_386	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_389	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_395	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
2_405	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0

[*]wb = wenig belastet, [#]Hofbildung, [+]Wachstum.

Acker b*, Gruppe 1: *P. nigricans*, 20 Isolate.																						
	Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.																					
Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC#	4MC+	Anis	Phth	Ter	Nic
7_179	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_181	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_184	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_185	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_188	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_191	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_195	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_203	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_214	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_215	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_220	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_226	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_227	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_251	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_252	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_257	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_258	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_261	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_275	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
7_276	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
*b = belastet, #Hofbildung, +Wachstum.																						

Wald ub*, Gruppe 2: *P. fellutanum*, 20 Isolate.

	Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.																					
Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC#	4MC+	Anis	Phth	Ter	Nic
W127	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W133	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W147	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W156	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W157	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W158	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W165	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W177	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W191	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W206	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W214	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W215	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W227	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W228	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W243	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W367	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W368	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W370	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W378	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W385	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

*ub = unbelastet, #Hofbildung, +Wachstum.

Halde b[*], Gruppe 2: *P. fellutanum*, 20 Isolate.

	Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.																					
Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC[#]	4MC[+]	Anis	Phth	Ter	Nic
H114	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H150	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H173	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H176	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
H239	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H241	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H248	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H271	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H275	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H288	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H293	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H298	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H302	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H307	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
H320	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H321	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H338	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H354	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H362	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
H381	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

[*]b = belastet, [#]Hofbildung, [+]Wachstum.

Wald ub[*], Gruppe 3: *P. frequentans*, 57 Isolate.

Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.

Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC[#]	4MC[+]	Anis	Phth	Ter	Nic
W136	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W142	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W143	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W145	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W151	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W159	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W160	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W162	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
W166	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W173	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W184	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W185	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
W189	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W194	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W198	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W202	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W211	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
W216	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
W217	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
W219	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W225	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W230	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W232	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W245	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
W246	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

[*]ub = unbelastet, [#]Hofbildung, [+]Wachstum.

Wald ub*, Gruppe 3: *P. frequentans*, 57 Isolate.																						
	Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.																					
Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC#	4MC+	Anis	Phth	Ter	Nic
W251	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W252	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W253	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W254	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W283	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
W284	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W289	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W291	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W292	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W293	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W295	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W297	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
W299	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W301	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
W305	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W313	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W316	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W317	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W319	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W320	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W321	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W326	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W327	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W328	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W331	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*ub = unbelastet, #Hofbildung, +Wachstum.																						

Wald ub*, Gruppe 3: *P. frequentans*, 57 Isolate.																						
	Aromatische Säuren: 1 = Nutzung, 0 = keine Nutzung.																					
Isolat-Nr.	Hip	4HB	4HC	3HB	Phal	Phac	Benz	Ver	2,4DHB	2HB	Cin	2AB	Man	4AB	Gent	2,6DHB	4MC#	4MC+	Anis	Phth	Ter	Nic
W335	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W336	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
W337	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W340	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W344	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
W345	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
W346	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
*ub = unbelastet, #Hofbildung, +Wachstum.																						

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Agrarökologie der *Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft* (*FAL*) Braunschweig angefertigt.

Herrn Dr. H.-H. Reber bin ich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft und kritische Durchsicht der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt meinem Mentor Herrn Prof. Dr. H.-J. Aust für die freundliche Übernahme des 1. Referats.

Herrn Prof. Dr. O. Larink danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats.

Frau S. Behn danke ich sehr für die schnelle und unkomplizierte Hilfe im Labor sowie eine stets freundliche Arbeitsatmosphäre.

Der Arbeitsgruppe von Frau Dr. T.-H. Anderson mit Frau M. Bota und Herrn K. Steffens möchte ich meinen herzlichen Dank für die Möglichkeit der Nutzung der Bildanalyseeinrichtung, der Respirometrieanlage und diverser Laboreinrichtungen aussprechen. Besonders möchte ich mich für die entspannte und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie der stetigen Hilfsbereitschaft bedanken.

Der Arbeitsgruppe von Frau Dr. C. Scholz-Seidel danke ich für die Bestimmung der Schwermetallgehalte in den Versuchsböden.

Herrn Dr. O. Heinemeyer möchte ich für die Behebung technischer Probleme an der Respirometrieanlage danken.

Den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Agrarökologie bin ich zu Dank für die stete Hilfsbereitschaft und ein freundliches Arbeitsklima verpflichtet.

Herrn Dr. S. Draeger vom Institut für Mikrobiologie der *T.U. Braunschweig* danke ich freundlichst für die Bereitstellung und Bestimmung von Pilzstämmen.

Herrn Dipl.-Min. D. Pütz der Firma *Nikon GmbH*, Düsseldorf, möchte ich sehr für den freundlichen Kundenservice bezüglich der Bildanalyseeinrichtung danken.

Der Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie von Herrn Dr. W.-R. Abraham der *Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH* (*GBF*) Braunschweig danke ich für die Möglichkeit, jederzeit das Clusteranalysenprogramm *Pirouette* zur Datenauswertung nutzen zu dürfen.

Meinen Eltern möchte ich Dank sagen für die jahrelange Unterstützung jeglicher Art.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projekts Re 290/12-1 zwei Jahre lang von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* (*DFG*) gefördert.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Michael Stelzer
Geburtsdatum	08.08.1971
Geburtsort	Braunschweig

Ausbildung

Schulischer Werdegang	1978-1982 Grundschule in Wendeburg 1982-1984 Orientierungsstufe in Wendeburg 1984-1987 Gymnasium *Ina-Seidel-Schule* in Braunschweig 1987-1991 Gymnasium *Hoffmann-von-Fallersleben* in Braunschweig Abitur 1991
Universität	WS 1991-WS 1997 Technische Universität *Carolo-Wilhelmina*, Braunschweig Studium der Biologie Vertiefungsfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Botanik und Genetik Juni 1996-Oktober 1997 Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Bodenbiologie der *FAL* Braunschweig über das Thema: *Nutzung der Bildanalyse bei der Bestimmung der Diversität pilzlicher Lebensgemeinschaften.* November 1997 Diplom-Prüfung
Berufsweg	November 1997-Oktober 1998 Literaturrecherche und Methodenstudien am Institut für Bodenbiologie der *FAL* Braunschweig zur Vorbereitung der Promotionsarbeit; Ausarbeitung eines Antrags für die Promotion (*DFG*). Oktober 1998-Oktober 2002 Erstellung einer Promotionsarbeit am Institut für Agrarökologie der *FAL* Braunschweig über das Thema: *Zusammenhang zwischen Stresstoleranz, Diversität und katabolischer Vielseitigkeit schwermetallgestresster Bodenpilze.*